

MTA Doktora Pályázat

Doktori Értekezés

**A MONOAMIN TRANSZPORTEREK FUNKCIONÁLIS
SAJÁTSÁGAI: DEPRESSZIÓVAL KAPCSOLATOS
KLINIKAI VONATKOZÁSOK**

DR. KISS JÁNOS

MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

Gyógyszerkutatási Osztály

Budapest, 2007

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	5
2. IRODALMI HÁTTÉR.....	7
2.1. A nem-szinaptikus ingerület-átvitel elmélete.....	7
2.2. A monoamin transzporterek jellemzői.....	9
2.3. A depresszió neurokémiai háttere.....	13
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	16
4. MÓDSZEREK.....	18
4.1. A vizsgálatok objektumai.....	18
4.1.1. Kísérleti állatok.....	18
4.1.2. Sejtenyészetek.....	19
4.2. <i>In vitro</i> [³ H]monoamin felszabadulás mérés: szeletperfúziós technika.....	20
4.3. <i>In vitro</i> [³ H]monoamin felvétel mérés: szinaptoszóma (P2) és szelet technika.....	21
4.3.1. Szinaptoszóma preparálás és transzmitter felvétel.....	21
4.3.2. Szelet preparátum és transzmitter felvétel.....	22
4.4. [³ H]nisoxetin receptor kötési vizsgálat.....	22
4.5. Egész sejt patch clamp technika.....	23
4.5.1. Na ⁺ -áramok mérése patkány ganglion cervicale superior sejteken.....	23
4.5.2. Na ⁺ -áramok mérése hippocampális sejtenyészeteken.....	23
4.5.3. NMDA-áramok mérése patkány kortikális sejtenyészeteken.....	24
4.6. <i>In vivo</i> transzmitterfelszabadulás mérés: mikrodialízis.....	25
4.6.1. DA felszabadulás mérése patkány striatumában.....	25
4.6.2. NA felszabadulás mérése egér hippocampusában.....	26
4.7. RT-PCR technika.....	27
4.8. Statisztikai módszerek.....	28
4.8.1. A nyugalmi monoamin felszabadulás eredményeinek feldolgozása szeletkísérletekben.....	28
4.8.2. Az elektromos ingerlés-kiváltotta monoamin felszabadulás eredményeinek feldolgozása szeletkísérletekben.....	29
4.8.3. A mikrodialízis kísérletek eredményeinek feldolgozása.....	31
4.8.4. A Woodhull-modell alkalmazása az elektromos távolság meghatározására.....	31
4.9. Anyagok.....	32

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS.....	33
5.1. A nitrogén monoxid szerepe a monoamineg transzmisszió szabályozásában: a monoamin transzporterekre gyakorolt hatás jelentősége.....	33
5.1.1. Nitrogén monoxid hatása a nikotin agonisták által kiváltott NA felszabadulásra patkány hippocampus szeletekből.....	33
5.1.2. Nitrogén monoxid hatása a nyugalmi DA felszabadulásra altatott patkány striatumában.....	35
5.1.3. Nitrogén monoxid hatása a DA visszavételre patkány striatum szeletekben.....	36
5.1.4. Az eredmények értelmezése: az endogén nitrogén monoxid gátló hatása a monoamin transzporterek működésére.....	37
5.1.5. A nitrogén monoxid transzporterekre gyakorolt hatásának jelentősége: a receptorok nélküli nem-szinaptikus kommunikáció elmélete.....	41
5.2. Nikotin agonisták hatása a monoamin transzporterek működésére: a carrier-mediálta transzmitter felszabadulás lehetséges jelentősége.....	45
5.2.1. Nikotin agonisták hatása az elektromos ingerlés-kiváltotta NA felszabadulásra patkány hippocampus szeletekből.....	45
5.2.2. A DMPP nyugalmi NA felszabadulásra kifejtett hatásának jellemzése.....	46
5.2.3. A DMPP nyugalmi DA felszabadulásra kifejtett hatásának jellemzése.....	50
5.2.4. A DMPP nyugalmi 5-HT felszabadulásra kifejtett hatásának jellemzése.....	52
5.2.5. DMPP hatása a [³ H]DA és [³ H]5-HT felvételre patkány agyi szinaptoszóma preparátumban.....	53
5.2.6. Az eredmények értelmezése: a DMPP carrier megfordító hatása.....	53
5.2.7. A carrier-mediálta transzmitter felszabadulás jelentősége: az aktív antidepresszánsok elmélete.....	60
5.3. Antidepresszánsok nem-konvencionális hatásai a központi idegrendszerben: a depresszió neurokémiai hátterének vizsgálata.....	65
5.3.1. Monoamin uptake gátló típusú antidepresszánsok hatása a központi idegrendszer nikotin receptoraira.....	65
5.3.2. Az eredmények értelmezése: nAChR-ok szerepe a depresszió kórélettanában.....	68
5.3.3. Monoamin uptake gátló típusú antidepresszánsok hatása a központi idegrendszer NMDA receptoraira.....	74
5.3.4. Az eredmények értelmezése: NMDA receptorok szerepe a depresszió kórélettanában.....	79

5.4. A monoamin transzporterek működésének vizsgálata genetikailag módosított, NA transzporter hiányos (NET KO) egereken: a heterológ visszavétel jelensége.....	83
5.4.1. A genetikai módosítás (NET hiány) igazolása: [³ H]nisoxetin kötés és PCR vizsgálat.....	83
5.4.2. A noradrenerg rendszer funkcionális jellemzése: [³ H]NA felvétel és felszabadulás vizsgálata.....	84
5.4.3. A NA felszabadulás preszinaptikus modulációjának vizsgálata <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i> : elektromos ingerlés-kiváltotta [³ H]NA felszabadulás és mikrodialízis kísérletek.....	86
5.4.4. Az eredmények értelmezése: a heterológ visszavétel jelensége.....	87
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	92
6.1. A nitrogén monoxid szabályozó szerepe a monoamin transzporterek működésében: a receptorok nélküli nem-szinaptikus kommunikáció elmélete.....	92
6.2. A nikotin agonisták által kiváltott carrier-mediálta felszabadulás és annak lehetséges jelentősége a depresszió kezelésében: az aktív antidepresszánsok elmélete.....	93
6.3. A monoamin uptake gátlók nem-konvencionális központi idegrendszeri hatásai: új célpontok azonosítása a depresszió kezelésében.....	95
6.4. A szerotonin transzporterek heterológ NA felvételi képessége: az SSRI vegyületek hatásmechanizmusával kapcsolatos klinikai vonatkozások.....	96
7. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE.....	98
8. IRODALOMJEGYZÉK.....	101
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	117
10. AZ ÉRTEKEZÉSBEN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	118

1. BEVEZETÉS

Az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetének Gyógyszerkutató Osztályán évtizedekre visszamenőleg központi kérdés volt a nem-szinaptikus ingerület-átvitel jellemzőinek vizsgálata, hiszen azt az elképzelést, hogy az idegrendszer sejtjei nemcsak szinapszisokon keresztül, de szinaptikus kapcsolatok nélkül is képesek lehetnek kommunikálni egymással, az osztály vezetője, Vizi Szilveszter professzor dolgozta ki és fogalmazta meg elsőként (Vizi, 1980a; Vizi, 1984). Jómagam is ebbe a munkába kapcsolódtam be az egyetem elvégzése után 1990-ben, és azonnal a monoaminerg rendszerek működési sajátágaival kezdtem foglalkozni. A monoaminerg rendszerek azért állnak szoros kapcsolatban a nem-szinaptikus teóriával, mert anatómiai felépítésük miatt elsődlegesen a nem-szinaptikus ingerület-átviteli forma segítségével kommunikálnak, varikozitásaik nagy része ugyanis nem képez szinapszist, de képes a transzmitterek ürítésére az extraszinaptikus térbe. A 90-es évek első felére esik az a felismerés, hogy a szervezetben termelődő nitrogén monoxidnak (NO) nemcsak kardiovaszkuláris hatásai lehetnek, de a szintetizáló enzim egyik izoformájának idegsejtekben történő expressziója miatt az idegrendszer működésének szabályozásában is részt vehet (Dawson és mtsai, 1991). Mivel a NO fizikokémiai tulajdonságai miatt a nem-szinaptikus kölcsönhatások ideális mediátora, érthető módon fokozott figyelemmel fordultunk a téma felé, és megkezdtük a NO monoaminerg ingerület-átvitelre gyakorolt hatásának vizsgálatát. Az ezzel kapcsolatos munka tartozik a disszertáció első témakörébe, melynek legfontosabb eredménye az idegrendszeri kommunikáció egy új formájának, a receptorok nélküli nem-szinaptikus kölcsönhatásnak a leírása.

A másik igen fontos téma a Gyógyszerkutató Osztályon a kolinerg-noradrenerg kölcsönhatások vizsgálata, ezen belül is a nikotin központi idegrendszeri hatásainak elemzése volt. A dohányzás kognitív funkciókat javító hatásában jelentős szerepet játszik a nikotin noradrenerg ingerület-átvitelre kifejtett serkentő hatása. Ezt a kérdéskört tanulmányozva (Vizi és mtsai, 1995; Sershen és mtsai, 1997) észleltük, hogy a nikotin agonisták között van egy vegyület, melynek összetettebb a hatása, mint a többi nikotin agonistának, ugyanis nemcsak a nikotinus acetilkolin receptor (nAChR) ingerlésével vált ki monoamin felszabadulást, hanem a monoamin transzporter működési irányának megfordítása révén is. E vegyület, a dimetilfenil piperazinium (DMPP) hatásmechanizmusainak vizsgálata képezi a második nagy témakört, és ez a munka eredményezte végül az aktív antidepresszánsok elméletének kidolgozását.

A DMPP hatásmechanizmusainak elemzése során észleltük, hogy a monoamin uptake inhibitor vegyületek képesek a nAChR által közvetített válasz gátlására is. A jelenség részletes vizsgálata képezi a disszertáció harmadik nagy témakörét, valamint ebből az eredményből kiindulva kezdtük el a monoamin uptake gátló típusú antidepresszánsok NMDA receptorokra gyakorolt hatásának vizsgálatát is. Eredményeink új lehetséges idegrendszeri célpontokat azonosítottak a depresszió kezelésében és közelebb vittek a depresszió neurokémiai hátterének tisztázásához.

Végül az utolsó nagy témakör a monoamin transzporterek monoaminerg ingerület-átvitelben betöltött szerepének és fontosságának vizsgálata volt, melyet genetikailag módosított, noradrenalin transzporter hiányos (NET KO) egereken folytattunk. E munka során megállapítottuk, hogy a szerotonin transzporterek képesek lehetnek a noradrenalin (NA) neuronális felvételére és így a szerotonerg varikozitások a szerotonin (5-HT) mellett NA-t is felszabadíthatnak. A fentebb ismertetett heterológ uptake és release jelensége fontos lehet a szelektív szerotonin reuptake inhibitor (SSRI) antidepresszánsok hatásmechanizmusának jobb megértésében.

Mint láthattuk, a disszertáció tárgyát képező kutatási témákban a NET KO állatokon folytatott munka kivételével az eredeti célkitűzések nem a monoamin transzporterek működési sajátosságainak felderítésére irányultak, azonban a kísérletek eredményei végülis mindig szoros kapcsolatban álltak a monoamin transzporterekkel. A NO a transzporterek működésének befolyásolásával fejt ki hatását, a nikotin agonista DMPP a transzporter működési irányának megfordításával okoz carrier-mediálta transzmitter felszabadulást, az antidepresszánsok nem-konvencionális, nAChR-ra és NMDA receptorra gyakorolt hatásai pedig a transzporterek csatorna sajátosságaira hívják fel a figyelmet. Mindez indokolja a disszertáció címének első felét. Ha végigtekintünk az eredményeken, láthatjuk, hogy a négy fő témakörből háromnak direkt kapcsolata van a depresszió kórélettanával illetve az antidepresszánsok működési mechanizmusaival, ami érthetővé teszi a cím második felét. Mindezek alapján a terjedelmi okok miatt kényszerűen rövid 'Irodalmi háttér' fejezetben három fontos témával foglalkozunk majd: 1.) a nem-szinaptikus kölcsönhatásokkal, hiszen ezek alapján indultak a kutatásaink, és két témakör (NO és aktív antidepresszánsok) egész direkt módon kapcsolódik a nem-szinaptikus teóriához, 2.) a monoamin transzporterekkel, mivel ezek képezik a disszertáció fő tárgyát, és 3.) a depresszió neurokémiai hátterével, hiszen eredményeink gyakorlati jelentőségét éppen az említett klinikai témával való szoros kapcsolat adja.

2. IRODALMI HÁTTÉR

2.1. A nem-szinaptikus ingerület-átvitel elmélete

Az agy működését az idegsejtek közötti kommunikáció, ezen belül is elsősorban a kémiai ingerület-átvitel teszi lehetővé. Igen sokáig tartotta magát az a nézet, hogy a neuronok kizárólag szinaptikus kapcsolatok révén érintkeznek egymással, hiszen morfológiailag csak ezeket a struktúrákat lehetett azonosítani. Az elmúlt 40 évben azonban egy új elképzelés nyert mind nagyobb teret, mely szerint az idegsejtek szinaptikus kapcsolatok nélkül is kommunikálhatnak egymással, és ennek a párbeszédnek fiziológiai jelentősége is lehet (Vizi, 1980a; Vizi, 1984). A 60-as évek végén Vizi professzor a világhírű farmakológus, Sir William Paton oxfordi laboratóriumában töltött két évet, ahol a bélben zajló ingerület-átviteli folyamatokat tanulmányozta. E munka során figyelte meg, hogy a NA α -adrenoceptorok ingerlése révén dózis-függő módon gátolja az acetilkolin (ACh) felszabadulását tengerimalac ileum hosszanti simaizom preparátumból, noha nincsenek morfológiailag kimutatható kapcsolatok a plexus myentericus kolinerg rostjai és a szimpatikus idegvégződészek között (Paton és Vizi, 1969; Knoll és Vizi, 1971). Ezek voltak az első adatok, melyek arra utaltak, hogy a neuronok képesek érintkezni egymással szinaptikus kapcsolatok nélkül is. Később a Vizi-csoport megfigyelte, hogy az ú.n. nem-szinaptikus kölcsönhatás nemcsak a periférián, hanem a központi idegrendszerben is előfordul (Vizi, 1979, Vizi, 1980b). Az elmúlt 30 évben felhalmozódó funkcionális és morfológiai megfigyelések igazolták, hogy bizonyos transzmitterek felszabadulhatnak a szinapszisokon kívül is, és diffúzió segítségével távoli receptorokhoz juthatnak el. A nem-szinaptikus ingerület-átvitel egyik fontos bizonyítéka volt a receptor-mismatch jelenségének felfedezése, mely szerint a transzmitter felszabadulás és a transzmitterekre érzékeny nagy affinitású receptorok nem feltétlenül ugyanazon a helyen találhatóak (Herkenham, 1987; McLean és mtsai, 1987). Az is kiderült, hogy az extraszinaptikus tér igen fontos kommunikációs csatornaként működik (Nicholson és Sykova, 1998), és az itt zajló nem-szinaptikus kölcsönhatásoknak fontos élettani szerepe van az idegrendszer működésében (Schneider és mtsai, 1994; Winkler és mtsai, 1995; Vizi, 2000; Kiss és Vizi, 2001). Napjainkra a nem-szinaptikus ingerület-átvitel elmélete általánosan elfogadott, hiszen az elmúlt évtizedekben számos független kutatócsoport talált bizonyítékot a neuronok között szinapszisok nélkül zajló kommunikációra és javasolt különböző elnevezéseket a jelenségre, mint paraszinaptikus ingerület-átvitel (Schmitt, 1984), 'volume-

transmission' (Agnati és mtsai, 1986; Zoli és mtsai, 1999), parakrin ingerület-átvitel (Bunin és Wightman, 1999) vagy diffúziós ingerület-átvitel (Bach-y-Rita, 1993).

A nem-szinaptikus kölcsönhatások konnektivitási viszonyai eltérnek a klasszikus ingerület-átvitelben megszokottól, hiszen a szinaptikus kapcsolat két, jól meghatározott sejt között jön létre, míg a nem-szinaptikus transzmisszió során a kémiai jelet kibocsátó sejt, akár több ezer, környezetében található sejtrel érintkezhet. A nem-szinaptikus kölcsönhatásokra jellemző, hogy lassú, akár percekben is mérhető az ingerület-átvitel, és sejtszinten kifejezetten nagy távolságokat (néhány száz μm -néhány mm) hidal át. A transzmitterek diffúzióval érik el a távoli receptorokat, melyeknek igen nagy, akár nanomoláris az affinitása, hiszen a diffúzió miatt a transzmitter koncentrációja meredeken, a felszabadulási helytől mért távolság harmadik hatványával csökken (Vizi és Labos, 1991; Vizi és Kiss, 1998). A nem-szinaptikus ingerület-átvitel elméletének egyik igen fontos következtetése, hogy a neuropszichiátriai gyakorlatban alkalmazott szerek elsődlegesen a nem-szinaptikusan elhelyezkedő receptorokon fejtik ki hatásukat, hiszen a néhány mikromólos extracelluláris koncentrációjuk effektíven befolyásolhatja a nagy affinitású extraszinaptikus receptorok működését, de kevésbé lehet hatékony a szinapszisokban elhelyezkedő, alacsony affinitású receptorokon, melyek általában néhány száz mikromólos endogén ligand koncentráció esetén jönnek ingerületbe (Vizi, 2000).

A nem-szinaptikus ingerület-átviteli forma különösen jellemző a monoaminerg rendszerekre, hiszen ezek közös sajátossága, hogy sejtjeik kis kéregalatti magvakban helyezkednek el, dúsan elágazó, varikózus axonrendszerük azonban nagy agyterületeket idegez be. Egy-egy sejthez akár több százezer varikozitás tartozhat, melyek képesek a NA, dopamin (DA) és 5-HT felszabadítására, noha döntő többségük (több mint 80 %-uk) nem képez szinapszist (Umbriaco és mtsai, 1995). A monoaminok extracelluláris koncentrációja két egymással ellentétes folyamat eredőjeként alakul ki. Az egyik az akciós potenciálok hatására létrejövő transzmitter felszabadulás, mely a monoaminokat tartalmazó vezikulák sejtmembránba való beolvadásának és kiürülésének (vezikuláris exocitózis) következménye. A másik a sejtmembránban elhelyezkedő monoamin transzporterek működésének köszönhető neuronális visszavétel, mely az extracelluláris térből a sejtplazmába juttatja a felszabadult transzmittereket. Mint látható, a monoamin transzporterek kulcsszerepet játszanak a monoaminerg ingerület-átvitel és így a nem-szinaptikus kölcsönhatások szabályozásában, ezért a következőkben röviden áttekintem legfontosabb tulajdonságaikat, melyek fontosak lesznek a disszertációban közölt kutatási eredmények értelmezésében is.

2.2. A monoamin transzporterek jellemzői

A kémiai ingerület-átvitel specificitásának egyik alapfeltétele, hogy a felszabadult neurotranszmitter nem tartózkodhat hosszabb ideig a receptorok közelében, mert máskülönben az elektromos jelek kémiai kódolása megbízhatatlanná válik. A monoaminerg ingerület-átvitel tanulmányozása során nyilvánvalóvá vált, hogy a NA, DA és 5-HT esetében a legfontosabb eltakarító mechanizmus nem az enzimatis lebontás (mint pl. az acetilkolin esetében), hanem a monoaminok neuronális visszavétele, melyet az idegsejtek plazmamembránjában elhelyezkedő fehérjék, a monoamin transzporterek biztosítanak. Kiderült, hogy noha minden monoaminnak létezik specifikus visszavételi rendszere, funkcionális sajátásaik igen hasonlóak. Már a 70-es években megfigyelték, hogy ezek a visszavételi rendszerek csak Na^+ - és Cl^- -ionok jelenlétében működnek, ezért besorolták őket a Na/Cl-dependens transzporterek családjába (Nelson, 1998). Mint később kiderült, ebbe a családba tartoznak a monoamin transzporterek mellett a GABA, a glicin, a prolin, a betain és a taurin transzporterek is (Amara és Arriza, 1993). A fehérjecsalád megismerése nagy lendületet kapott a kilencvenes évek elején, amikor eredményesen klónozták a GABA transzportert (Nelson és mtsai, 1990), majd az itt szerzett ismeretek birtokában sikerült klónozni és szekvenálni az összes monoamin transzportert is. Megállapították, hogy mindegyik transzporter kb 69000 kD molekulatömegű, egyetlen aminosavláncból álló fehérje, a humán NA transzportert (NET) 617 aminosav alkotja (Paczholczyk és mtsai, 1991), a humán DA transzporter (DAT) 619 aminosavból épül fel (Shimada és mtsai, 1991), míg a humán 5-HT transzporter (SERT) 630 aminosavból áll (Ramamoorthy és mtsai, 1993). A szekvencia analízis kimutatta, hogy a monoamin transzporterek nagyfokú homológiát mutatnak, a humán DAT 67 %-ban azonos a humán NET-tel, és a nem-konzervatív szubsztitúciókat is figyelembe véve a szekvencia hasonlóság már 81 %-os. A SERT nagyobb eltéréseket mutat, de a NET-tel mutatott aminosav azonosság még mindig meghaladja a 48 %-ot. Mindez azt eredményezi, hogy a monoamin transzporterek struktúrális felépítése is nagyon hasonló: a hidrofóbicitási térkép alapján 12 transzmembrán (TM) régiót sikerült azonosítani bennük, melyek aminosav szekvenciája különösen konzervatív, mivel több mint 90 %-ban megegyezik minden transzporterben. Az N- és a C- végződés intracellulárisan található, és mindegyik transzporter tartalmaz egy nagy extracelluláris loopot a harmadik és negyedik TM régió között. A transzporterek harmadlagos struktúrája még nem ismert, azonban a velük nagy hasonlóságot mutató bakteriális leucin transzportert már sikerült kristályosítani és

röntgen diffrakciós módszerrel elemezni (Singh és mtsai, 2007; Zhou és mtsai, 2007), ami valószínűsíti, hogy a monoamin transzporterek térszerkezetére is hamarosan fény derül.

A monoamin transzporterek elsődleges feladata a transzmitterek eltávolítása az extracelluláris térből. Működésükhöz a Na^+ -ion elektrokémiai gradiense szolgáltat energiát, normál körülmények között ugyanis az extracelluláris Na^+ -koncentráció 140 mM, míg az intracelluláris 10 mM körül mozog. A NET transzport-ciklusa során először egy Na^+ -ion, majd a szubsztrát, végül egy Cl^- -ion kötődik a carrierhez és a transzlokáció ezután zajlik le. Az intracelluláris oldalon először a Na^+ -ion disszociálódik le, majd a szubsztrát és a Cl^- -ion (Trendelenburg, 1991). A többi monoamin transzporter hasonlóan működik, kisebb nagyobb eltérésekkel. A DAT esetében két Na^+ -ion és egy Cl^- -ion kötődik be, míg a SERT a NET-hez hasonlóan csak egy Na^+ - és egy Cl^- -iont használ, azonban működését egy K^+ -ion is segíti, mely a transzport ciklus lezajlása után kapcsolódik a carrierhez az intracelluláris oldalon és az extracelluláris térbe transzportálódik, miközben elősegíti a transzporter alapállapotba való visszatérését (Rudnick és Clark, 1993). Mivel a szubsztrát általában pozitív töltést hordoz, a felvételi folyamat elektrogenikus, azaz depolarizálja a sejtmembránt. A transzport-ciklus nem túl gyors, másodpercenként mindössze 2-10 szubsztrát felvételét teszi lehetővé. Érdekes megfigyelés, hogy a SERT esetében két működési állapotot írtak le. Alacsony extracelluláris 5-HT koncentráció mellett a hagyományos lassú felvétel zajlik, azonban magas (több száz μM -os) szubsztrát koncentráció esetén a transzporter 5-HT csatornává tud alakulni, mely sokkal nagyobb mennyiségű 5-HT molekula sejtbe jutását teszi lehetővé (Petersen és DeFelice, 1999).

A monoamin transzporterek csatorna-tulajdonságai. Más megfigyelések is alátámasztják, hogy a monoamin transzporterek bizonyos csatorna-tulajdonságokkal rendelkeznek. Kimutatták, hogy NET-transzfektált HEK-sejtekben a NA felvétel és az elektrofiziológiailag tapasztalható áramok között óriási különbségek vannak. Megállapították, hogy míg a transzporter kb. 10 NA molekulát juttat be a sejtbe másodpercenként, addig nagyjából 10000 töltés is bekerül (Galli és mtsai, 1995), tehát a korábban ismertetett sztöchiometriával szemben 3 nagyságrenddel nagyobb töltés fluxus észlelhető. Ugyanebben a tanulmányban megfigyeltek a NET-en keresztüli szivárgó áramokat is, melyek nem kapcsolódtak a NA felvételéhez, viszont gátolhatóak voltak különböző uptake gátlókkal. Hasonló jelenségeket a DAT-tal (Sonders és mtsai, 1997; Carvelli és mtsai, 2004) és a SERT-tel (Mager és mtsai, 1994) kapcsolatban is leírtak. Az adatok alapján nem egyértelmű, hogy ezek a nem-sztöchiometrikusan kapcsolt ionáramok, szerepet játszanak-e a szubsztrát transzlokációban vagy sem, de az bizonyosnak látszik, hogy a csatorna-tulajdonságok

alaposabb tisztázása közelebb vihet a monoamin transzporterek működésének megértéséhez (Lester és mtsai, 1996, Sonders és Amara, 1996). A jelen disszertációban ismertetésre kerülő eredmények közül a monoamin uptake gátlók ionotróp receptorokra gyakorolt gátló hatása (5.3. fejezet) egyfajta farmakológiai alátámasztásként is felfogható a monoamin transzporterek csatornáinak funkcionális jelentőségére.

Carrier-mediálta transzmitter felszabadulás. Normál körülmények között a monoamin transzporterek kívülről a sejtbe juttatják a transzmittereket, azonban bizonyos feltételek mellett a folyamat megfordulhat és a transzporter a citoplazmából az extracelluláris térbe szállítja a monoaminokat. Ezt a jelenséget carrier-mediálta transzmitter felszabadulásnak nevezzük (Levi és Raiteri, 1993). Előfordulásának három fő okát ismerjük. Az első kiváltó ok a citoplazmatikus transzmitter koncentráció megnövekedése lehet. Ez különösen jellemző a monoaminokra, melyeknél általában a citoplazmatikus lebontó enzim, a monoamin-oxidáz (MAO) és a hatékony vezikuláris uptake rendszer (VMAT2) általában igen alacsony citoplazma koncentrációt eredményez. Bizonyos szerek, melyek bénítják a vezikuláris transzportot (pl. rezerpin), gátolják a lebontást (pl. MAO inhibitorok), vagy elősegítik a vezikulák intracitoplazmatikus ürülését, szivárgását (pl. amfetamin), gyorsan megemelhetik a sejtben a szabad monoamin koncentrációt, ami a carrier működési irányának megfordulásához vezethet. A másik kiváltó ok a Na^+ -gradiens csökkenése lehet, mely általában az intracelluláris Na^+ -koncentráció megemelkedése miatt történik meg, amit a Na^+/K^+ -ATP-áz enzim bénítása, vagy a Na^+ -csatornák nyitott állapotban való rögzítése (pl. veratridin által) idéz elő. A veratridin carrier-megfordító hatását kutatócsoportunk is vizsgálta egyik tanulmányában (Gerevich és mtsai, 2001). Végül a harmadik kiváltó ok a transzporterek endogén transzmittertől különböző szubsztrátjainak extracelluláris jelenléte. Ebben az esetben egyfajta csere-mechanizmus indul be, amikor is a szubsztrát analóg bejut a sejtbe a transzporter segítségével, míg a transzporter alapállapotba való visszatérése során neurotranszmittereket szállít magával és juttat ki az extracelluláris térbe. A disszertációban ismertetett egyik témakörünk ezzel a jelenséggel foglalkozik, hiszen a DMPP által kiváltott monoamin felszabadulás hátterében éppen ez a csere-mechanizmus áll (5.2. fejezet). A carrier-mediálta transzmitter felszabadulás a vezikuláris exocitózis mellett a másik fontos lehetőség arra, hogy az idegsejtekből neurotranszmitter jusson az extracelluláris térbe, ezért a két folyamat elkülönítése a neurokémiai vizsgálatok egyik alapkérdése. A vezikuláris exocitózis esetén a transzmitter felszabadulás a vezikulából történik, éppen ezért Ca^{2+} -függő a folyamat, modulálható preszinaptikus receptorok által, viszont nem gátolható uptake inhibitorokkal. Ezzel szemben a carrier-mediálta felszabadulás a citoplazmából történik, nem

függ a Ca^{2+} -ionoktól, de értelemszerűen Na^{+} -függő, nem modulálható preszinaptikus receptorok által, de gátolható uptake inhibitorokkal. A DMPP hatásmechanizmusának elemzésénél fel is használtuk a fenti tulajdonságokat az anyag hatásának neurokémiai jellemzésére (5.2. fejezet).

A monoamin transzporterek szelektivitása. Minden monoaminnak van saját specifikus plazmamembrán transzportere, azonban a már ismertetett nagyfokú struktúrális hasonlóság miatt funkcionálisan nem olyan éles az elkülönülés. A monoaminerg pályák vizsgálatánál előszeretettel alkalmazták a triciált monoaminokat, mint jelölő anyagokat, és a pályák lefutását autoradiográfiás módszerrel derítették fel. Ezen vizsgálatok során megfigyelték, hogy a szerotonerg és noradrenerg idegvégződések képesek a $[^3\text{H}]\text{DA}$ felvételére (Berger és Glowinski, 1978; Descarries és mtsai, 1987). Hasonló módszerekkel igazolták, hogy a dopaminerg terminálisok felvehetnek $[^3\text{H}]\text{NA}$ -t és $[^3\text{H}]\text{5-HT}$ -t is (Doucet és mtsai, 1988). Későbbi funkcionális vizsgálatok kimutatták, hogy a NET hatékonyabban veszi fel a DA-t mint saját szubsztóját, a NA-t (Buck és Amara, 1994). A jelenséget heterológ visszavételnek nevezzük, és fiziológiás jelentőségét mutatja, hogy bizonyos agyterületeken (pl. prefrontális kéreg) a dopaminerg beidegzésből felszabaduló DA visszavételét a noradrenerg terminálisokon elhelyezkedő NET látja el, mivel a DAT sűrűség igen alacsony (Ciliax és mtsai, 1995; Sesack és mtsai, 1998). A kérdést részletesebben is tárgyaljuk a NET hiányos egereken folytatott kísérleteink ismertetésénél (5.4. fejezet), ahol a heterológ visszavétel egy másik formáját írjuk le.

A monoamin transzporterek szabályozása. A transzporterek működése szempontjából a legfontosabb tényező az energiát szolgáltató Na^{+} -ion elektrokémiai gradiense, mely két fő tényezőből áll össze; az egyik maga az extra- és intracelluláris Na^{+} -ion koncentráció különbsége, a másik az aktuális membránpotenciál. Az ion koncentráció változásának hatásáról már szoltam a carrier-mediálta felszabadulás tárgyalásánál, a membránpotenciál szerepéről azonban még nem. Ez utóbbi jelentős mértékben befolyásolja a transzporter aktivitását, hiszen depolarizáció esetén csökken, míg hiperpolarizáció esetén nő a meghajtóerő, azaz minél aktívabb egy idegsejt, annál kevésbé működik a neuronális monoamin visszavétel. A másik fontos szabályozási tényező a transzporterek proteinkinázok általi foszforilációja és foszfatázok általi defoszforilációja, melyre az aminosavláncban intra- és extracellulárisan elhelyezkedő szerin és treonin reziduumok adnak lehetőséget (Amara és Kuhar, 1993). Érdekes szabályozási lehetőséget teremt az SH-tartalmú ciszteinek jelenléte, mely aminosavak reverzibilisen nitrozilálódnak a NO által, és így átmenetileg csökken a

transzporterek aktivitása. A mechanizmusnak központi szerepe van a NO monoaminerg transzmisszióra gyakorolt hatásában, melyet részletesen elemzünk az 5.1. fejezetben.

A monoamin transzporterek humán farmakológiai jelentősége. Neurofarmakológiai szempontból a monoamin transzporterek számos központi idegrendszerre ható szer célpontjai. Jól ismert, hogy a kokain elsődlegesen a DA transzporter gátlásán és a következményes DA szint emelkedésén keresztül fejt hatását, míg az amfetaminok a transzporter működési irányának megfordításával váltanak ki jelentős monoamin felszabadulást (Sulzer és mtsai, 2005). Talán még ennél is fontosabb azonban a monoamin transzportereknek a depresszió kezelésében betöltött szerepe, hiszen a jelenleg használt antidepresszánsok döntő többsége a monoamin transzporterek gátlásán keresztül éri el terápiás hatását. Nem véletlen tehát, hogy a disszertációban ismertetett eredmények többségének szoros kapcsolata van a depresszió témakörével, így a következő fejezetben röviden áttekintjük a depresszió neurokémiai hátterével kapcsolatos ismereteket.

2.3. A depresszió neurokémiai háttere

A depresszió az egyik legfontosabb neuropszichiátriai betegség, élettartamra vetített előfordulási gyakorisága 5-25 % között mozog a vizsgált populációtól függően (Blazer és mtsai, 1994, Weissman és mtsai, 1996). A depresszió kezelése és a kapcsolódó indirekt kiadások súlyos anyagi terhet jelentenek a társadalom számára. Egy friss, 28 európai országra és 466 millió emberre kiterjedő felmérés szerint 2004-ben a vizsgált népesség 5 %-a vált érintetté a depresszióban. A költségek elemzése kimutatta, hogy a 42 milliárd Eurós direkt kiadásokból 22 milliárd Eurót a járóbeteg ellátás, 10 milliárd Eurót a kórházi ellátás, 9 millió Eurót pedig a gyógyszer-kiadások emésztettek fel. A megbetegedésekkel és halálozásokkal összefüggő indirekt kiadások 76 milliárd Eurót tettek ki. A depresszióval kapcsolatos összesített kiadások 118 milliárd Euróra rúgtak, ami a teljes európai GDP 1 %-ának felelt meg (Sobocki és mtsai, 2006). Érthető tehát, hogy az antidepresszánsok az egyik legfontosabb központi idegrendszeri gyógyszercsoportot alkotják. Gyógyszerpiaci részesedésük folyamatosan növekszik, az SSRI vegyületek forgalma a 90-es évek végén már meghaladta a 10 milliárd dollárt (Nestler és mtsai, 2002). Az elmondottak ellenére a depresszió kezelésében nem történt forradalmi előrelépés az elmúlt évtizedekben. A jelenleg használt legújabb szerek klinikai hatékonysága nem jobb, mint a 40 évvel ezelőttieké, az egyetlen lényeges különbség a kedvezőbb mellékhatás profilban fedezhető fel (Wong and Licinio, 2001). Habár jelenleg több mint 30 antidepresszáns van forgalomban, az eredményes

kezelések aránya egyik szer esetén sem haladja meg az 50-60 %-ot, ami azt jelenti, hogy a betegek mintegy 40 %-a nem reagál a kezdeti gyógyszeres kezelésre. Még többféle antidepresszáns használata esetén sem magasabb a sikerráta 70 %-nál. Ez különösen csalódást keltő, ha figyelembe vesszük, hogy a megfelelő módon megtervezett placebo-t használó klinikai vizsgálatokban a placebo-t kapó betegek jelentős részénél, akár 50 %-ánál is megfigyelhető javulás (Walsh és mtsai, 2002).

A jelenleg leginkább elfogadottnak tekintett elképzelés szerint a depresszió kiváltó oka a monoaminerg transzmisszió elégtelensége, melynek következtében lecsökken az extracelluláris NA és/vagy 5-HT koncentráció (Schilkraut, 1965; Doris et al., 1999). A monoamin teória alapját azon megfigyelések képezték, miszerint a depresszió kezelésében véletlenszerűen hatásosnak bizonyuló szerek közös tulajdonsága, hogy valamilyen módon serkenteni képesek a monoaminerg ingerület-átvitelt. Az antihisztaminokkal kapcsolatos kutatások során ismerték fel, hogy a triciklikus vegyületek (pl. imipramin) javítják a betegek hangulati életét. Hasonlóan véletlen felfedezés volt, hogy a tuberkulózis kezelésében használt MAO inhibitorok (pl. iproniazid) szintén antidepresszáns hatásúak. Mivel a triciklikus vegyületek gátolják a NA visszavételét, a MAO inhibitorok pedig megakadályozzák a monoaminok citoplazmatikus lebontását, kézenfekvőnek tűnt az a feltételezés, hogy kedvező klinikai hatásuk a lecsökkent monoamin szintek normalizálásával hozható összefüggésbe (Nestler és mtsai, 2002). Az elméletet az is alátámasztotta, hogy a monoamin raktárakat kiürítő rezerpin a depresszió klinikai tüneteit (levertség, szomorúság, anhedónia) produkálta, valamint a katekolaminok mennyiségét csökkentő diétával a depresszió tünetei súlyosbodtak (Wong és Licinio, 2001). Mindazonáltal az elmúlt 30 évben számos olyan megfigyelés halmozódott fel, ami nincs összhangban a monoamin teóriával. E témakört részletesen tárgyalja néhány kiváló összefoglaló munka (Hindmarch, 2001; Nestler és mtsai, 2002), így a jelen disszertációban terjedelmi okok miatt csak a legjelentősebb ellentmondásokra hívnám fel a figyelmet. Az egyik legfontosabb probléma, hogy az antidepresszánsok klinikai hatásának kifejlődéséhez több hétre van szükség, noha a monoaminerg ingerület-átvitelre gyakorolt serkentő hatásuk már egy-két órával a bevétel után érvényesül. A másik fő gond, hogy időközben megjelentek olyan szerek is a klinikai gyakorlatban, melyek hatékony antidepresszánsok, azonban vagy nem gyakorolnak hatást a monoaminerg transzmisszióra, mint az iprindol, vagy éppen hogy csökkentik az extracelluláris monoamin szinteket, mint a tianeptin, ami fokozza a 5-HT felvételét (Wilde és Benfield, 1995). Mindezek hatására az elmúlt években számos alternatív hipotézis született a depresszió etiológiájával kapcsolatban, melyekben többek között felmerült a nikotin receptorok és a kolinerg transzmisszió (Shytle és

mtsai, 2002), illetve az NMDA receptorok és a glutamáterg transzmisszió (Palucha és Pilch, 2005) lehetséges szerepe. E két elképzeléssel részletesebben is foglalkozunk az 5.3. fejezetben az antidepresszánsok nem-konvencionális hatásaival kapcsolatos eredményeink tárgyalásánál. Az említetteken kívül még számos egyéb teória is született, melyek a stresszel kapcsolatos hormonális hatások (CRF, glukokortikoidok, arginin, vazopresszin), különböző citokinek, megváltozott második hírvivő rendszerek (cAMP, foszfolipid metabolizmus) vagy az abnormális Ca^{2+} -homeosztázis jelentőségét hangsúlyozzák (Hindmarch, 2001). Érdekes módon elképzelhető, hogy mindegyik javasolt elképzelésnek van igazságalapja. A depresszió egyik legmodernebb felfogása, az ún. network hipotézis szerint ugyanis a depresszió elsődleges kiváltó oka az idegrendszert érő különböző ártalmas hatások következtében fellépő sejtdegeneráció illetve sejtpusztulás. Emiatt először csökken a szinaptikus kapcsolatok száma, majd a neurális hálózatokat felépítő sejtek száma is, ami az információfeldolgozás zavaraihoz, végeredményben pedig a depresszió kialakulásához vezet (Castren, 2005). Az elmélet szerint az antidepresszánsok hatása azért fejlődik ki lassan, mert az általuk indukált plaszticitási folyamatokhoz, melyek az ideghálózatok regenerációját segítik elő, hosszabb időre van szükség. Az elképzelést igazolni látszik az a megfigyelés, miszerint az antidepresszánsok serkentik az új idegsejtek képződését patkány hippocampusában (Malberg és mtsai, 2000). Az elmélet elegánsan képes egyesíteni a korábban említett számos depresszió teóriát, hiszen az agyi sejthálózatokat a korábban felsorolt tényezők mindegyike képes befolyásolni, így az említett rendszerek megfelelő irányba történő elmozdulása előidézheti a hálózatok ismertetett leépülését és a depresszió következményes kialakulását. Az antidepresszánsok nem-konvencionális hatásaival kapcsolatos megfigyeléseink szépen illeszkednek a network-hipotézis kereteibe (5.3. fejezet).

3. CÉLKITŰZÉSEK

A monoaminerg ingerület-átvitel jellemzően nem-szinaptikus jellegű, ezért kutatócsoportunk érdeklődési körének megfelelően kísérleteinkben elsődlegesen a monoaminerg rendszerek működésének különböző aspektusait kívántuk vizsgálni, a kibontakozó eredmények azonban minden esetben a monoamin transzporterek működési tulajdonságaival kapcsolatos eredményekhez vezettek. Munkánk során a következő fő kérdésekre kerestük a választ:

1. **Milyen módon befolyásolja a szervezetben termelődő NO a monoaminerg ingerület-átvitelt a központi idegrendszerben?** Általános megközelítésként különböző nitrogén monoxid szintetáz (NOS) gátló szerek felhasználásával megakadályoztuk a NO szintézisét és megfigyeltük a monoaminerg ingerület-átvitelben bekövetkező változásokat. A munka során tanulmányoztuk a NOS gátlók hatását a.) a nikotin agonisták által kiváltott *in vitro* NA felszabadulásra patkány hippocampus szeletekből, illetve b.) az *in vivo* nyugalmi DA felszabadulásra altatott patkány striatumában mikrodialízis technika felhasználásával. A NO hatásmechanizmusának tisztázása érdekében vizsgáltuk a NO donorok illetve NOS gátlók hatását a DA felvételre patkány striatum szeletekben.
2. **Hogyan hatnak a különböző nikotin agonisták a központi idegrendszeri NA felszabadulásra?** Az elsődleges eredmények után világossá vált, hogy a DMPP nevű agonistának komplex, több tényezőből álló hatása van, ezért tisztázni kívántuk, milyen mechanizmusok vesznek részt a DMPP által kiváltott NA felszabadulásban patkány hippocampus szeletekből. Az eredmények alapján felmerült, hogy e komplex hatás a többi monoaminerg rendszer esetén is érvényesülhet, ezért vizsgáltuk a DMPP-kiváltotta DA és 5-HT felszabadulásban szerepet játszó mechanizmusokat patkány striatum és hippocampus szelet preparátumokban.
3. A DMPP hatásmechanizmusának vizsgálata során kiderült, hogy az antidepresszáns terápiában széles körben alkalmazott monoamin uptake inhibitorok gátolni képesek a központi idegrendszer nAChR-ai által közvetített válaszokat. Ezért vizsgálni kívántuk, hogy **milyen mértékben függ a monoamin uptake gátlók nAChR antagonista tulajdonsága a vegyületek kémiai szerkezetétől és szelektivitásától, milyen erősségű ez a hatás az egyes vegyületek esetén és milyen mechanizmusok játszhatnak szerepet**

kialakulásában. A kísérletekben tanulmányoztuk a különböző monoamin uptake gátlók hatását a nikotin-kiváltotta NA felszabadulásra patkány hippocampus szeletekből, és a hatásmechanizmus tisztázása érdekében az említett vegyületek Na⁺-csatornákra kifejtett hatását egész sejtés patch clamp technika segítségével.

A nAChR-okkal kapcsolatos eredmények alapján felmerült, hogy az antidepresszáns vegyületek az NMDA receptorok működését is befolyásolhatják, ezért egész sejtés patch clamp technika segítségével vizsgáltuk, **milyen hatást gyakorol a triciklikus desipramin és az SSRI fluoxetin az NMDA-kiváltotta áramokra patkány kortikális sejttényészetekben.**

4. **Milyen szerepet játszik a NA transzporter a noradrenerg ingerület-átvitel szabályozásában?** A kérdést NA transzporter-hiányos (NET KO) egereken folytatott funkcionális neurokémiai kísérletek (*in vitro* transzmitter felvétel és felszabadulás egér hippocampus szeletekben, *in vivo* NA felszabadulás altatott egér hippocampusában) segítségével vizsgáltuk. Ezen kívül tanulmányoztuk a preszinaptikus α_2 -adrenoceptorok által közvetített szabályozási mechanizmusok változásait is a genetikailag módosított állatokban.

4. MÓDSZEREK

Kísérleteinkben funkcionális neurokémiai, neurofarmakológiai, illetve elektrofiziológiai vizsgálatokat folytattunk *in vitro* szeletperfúziós technika, szelet és szinaptoszómális uptake, receptorkötés, egész sejtes patch clamp technika és *in vivo* mikrodialízis segítségével, de használtunk bizonyos molekuláris biológiai módszereket (RT-PCR) is. A mérések döntő többségét az MTA KOKI Gyógyszerkutató Osztályán saját laboratóriumunkban, a Gyógyszerhatástani Laboratóriumban, illetve kooperációban Dr. Zsilla Gabriellával (uptake és binding) és Dr. Mike Árpáddal (elektrofiziológia) végeztük. A szeletkísérletek kisebb részét a Center for Neurochemistryben (Orangeburg, NY, USA) Dr. Lajtha Ábel professzorral együttműködve hajtottuk végre. Az elektrofiziológiai adatok egy része Dr. Illés Péter professzorral (Rudolf Boehm Institute of Pharmacology and Toxicology, University of Leipzig, Németország) együttműködésben készült. Az összes kísérleti eljárást felülvizsgálta a Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság, a kísérleteket az illetékes felügyeleti szervek érvényes engedélyével végeztük és azok minden tekintetben megfeleltek az állatkísérleteket szabályozó hatályos törvényeknek, valamint az ennél szigorúbb irányelveket megfogalmazó Intézeti Állatetikai Kódexnek.

4.1. A vizsgálatok objektumai

4.1.1. Kísérleti állatok

Patkányok. A szeletkísérletekben főként 140-200 g súlyú hím Wistar állatokat használtunk, kivéve az USA-ban folytatott kísérleteket, ahol 150-200 g súlyú hím Sprague-Dawley állatokkal dolgoztunk. A mikrodialízis kísérletekben 280-350 g súlyú hím Wistar patkányokat használtunk. A kísérletek tervezésénél minden esetben törekedtünk a lehető legkevesebb állat felhasználására és a lehető legkevesebb szenvedés okozására.

Egerek. A genetikailag módosított noradrenalin transzporter hiányos (NET KO) állatok vizsgálatakor az eredeti NET KO és vad típusú (WT) egereket Dr. Marc Caron professzortól kaptuk (Duke University Medical Center, Durham, NC, USA). Az állatok C57BL/6J genetikai háttérű egerek voltak, és olyan specifikus DNS konstrukciót tartalmaztak, melyről korábban bizonyították, hogy a NET genetikai hiányát eredményezi (Xu és mtsa, 2000). A kísérleteket közös alomból származó, 3-5 hónapos felnőtt, mindkét nemhez tartozó homozigóta knock-out (NET^{-/-}) és vad típusú (NET^{+/+}) 20-29 g súlyú állatokon hajtottuk végre. A tenyésztést a heterozigóta állatok keresztezésével tartottuk fenn. A ketrecenkénti

3-4 egeret, hasonlóan a patkányokhoz, 12 órás fény-sötétség ciklus alatt tartottuk, tetszés szerint elérhető táplálék és ivóvíz biztosítása mellett.

4.1.2. Sejtenyészetek

Ganglion cervicale superior sejtek rövid távú szövet kultúrája. A patkány felső nyaki ganglionjából származó szimpatikus idegsejteket a korábban részletesen ismertetett módszer szerint izoláltuk (Tóth és Miller, 1995). Röviden, az 1-5 napos (posztnatális) Wistar patkányokat elaltattuk, mellkasukat felnyitottuk és kipreparáltuk a felső nyaki szimpatikus gangliont. A kimetszett ganglionokat 0.2% tripszinnel (Sigma) enzimatikusan kezeltük, és a széttemésztődés után poly-L-lysinnel borított tárgylemezekre szétterítettük. A sejteket egy éjszakán keresztül L-15 alapú, 5 %-os patkány szérummal (GIBCO), 1 µg/ml ideg növekedési faktorról (mNGF 7S, Alomone Labs, Jerusalem), glikózzal, bikarbonáttal és vitaminokkal kiegészített tenyészoldatban tartottuk, és a következő napon használtuk fel elektrofiziológiai (Na^+ -áram) mérésekre.

Kortikális és hippocampális sejtenyészetek. Az idegsejt kultúrákat a korábban leírtaknak megfelelően készítettük el (Wirkner és mtsai, 2000; Fischer és mtsai, 2002). Röviden, a 17-18. terhességi napon levő patkányokat ketamin (50 mg/ml) és xylazin (10 mg/ml) keverékével elaltattuk. Az uterust egyben kimetszettük és lamináris légáramlási dobozba helyeztük. Ettől a lépéstől kezdve a preparálást steril környezetben folytattuk. A foetusokat egyenként izoláltuk, és az egész agyat jéghideg minimal essential medium (MEM) oldatba helyeztük és ott is tartottuk a további preparálásig. Összesen 4-6 foetus kortextét illetve hippocampusát metszettük ki és 0.25 %-os tripszin oldatban emésztettük 10 percig. Ezután mechanikusan elkülönítettük a sejteket 10 % fetális bovin szérum albumint tartalmazó MEM oldatban, és poly-L-lysinnel borított 35 mm átmérőjű Petri-csészékbe helyeztük 150000-300000 sejt/edény koncentrációban. A közeget 24 órás inkubálás után lecseréltük B27-tel kiegészített Neurobasal mediumra (GIBCO), melyben 25 µM 2-mercaptoethanol, 0.5 mM glutamin és 25 µM glutamát volt. Az oldat felét hetente kétszer lecseréltük glutamátot nem tartalmazó Neurobasal+B27-es médiumra. Az elektrofiziológiai méréseket (NMDA áramok vagy Na^+ -áramok) 7-21 napos tenyészeteken végeztük.

4.2. *In vitro* [³H]monoamin felszabadulás mérés: szeletperfúziós technika

A módszer segítségével a [³H]DA, [³H]NA illetve [³H]5-HT felszabadulást tanulmányoztuk különböző munkáinkban (Kiss és mtsai, 1996; Kiss és mtsai, 1997; Hennings és mtsai, 1997; Kiss és mtsai, 1999; Hennings és mtsai, 1999; Kiss és mtsai, 2001; Vizi és mtsai, 2004c; Szasz és mtsai, 2005; Szasz és mtsai, 2007b). A vizsgálatokban 140-200 g súlyú hím Wistar vagy Sprague Dawley patkányokat, illetve 20-29 g súlyú mindkét nemhez tartozó C57BL/6J egereket használtunk. Ugyanazt a preparálási módszert használtunk mindkét faj esetén. Az állatokat nyaktiló segítségével dekapitáltuk, agyukat gyorsan eltávolítottuk és hideg, buborékolatott Krebs-oldatba helyeztük. A különböző agyterületeket (hippocampus, striatum, frontális kéreg) kipreparáltuk, majd egy McIlwain chopper segítségével 400 µm vastagságú szeletekre vágtuk. A szeleteket 45 percig inkubáltuk 37 °C-on 1 ml, 10 µCi tríciummal jelölt monoamint (30-50 Ci/mmol specifikus aktivitású [³H]NA-t, 46 Ci/mmol specifikus aktivitású [³H]DA-t vagy 15,7 Ci/mmol specifikus aktivitású [³H]5-HT-t) tartalmazó, folyamatosan buborékolatott Krebs oldatban (összetétele mM-ban: NaCl 113, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, glükóz 11.5, aszkorbinsav 300 µM, Na₂EDTA 30 µM). Az inkubációs idő leteltével az agyszeleteket - kamránként négy-hat - egy alacsony térfogatú 4 csatornás mikroperfúziós készülékbe helyeztük (Vizi és mtsai, 1986). A karbogénnel (95 % O₂, 5 % CO₂) buborékolatott Krebs oldatot 0.6 ml/perc sebességgel áramoltattuk a kamrákon át. Az első hatvan percben, az ún. preperfúzió során nem gyűjtöttük a kifolyó oldatot, majd ezt követően 3 perces mintákat szedtünk. A nyugalmi transzmitter felszabadulás vizsgálata során nem alkalmaztunk elektromos ingerlést, a különböző agonistákat (nikotin, DMPP, NMDA, stb.) általában a 4. frakciótól kezdtük adni (az ettől eltérő adagolást a kísérleteknél külön jelezzük), az antagonistákat (mekamilamin, MK-801) 2 frakcióval korábban kezdtük adni, az uptake gátlók, NOS gátlók általában jelen voltak a preperfúzió kezdetétől. A Ca²⁺ nélkül folytatott kísérletekben a preperfúziótól kezdve 1 mM EGTA-t tartalmazó Ca²⁺-mentes Krebs-oldatot használtunk. Az elektromos ingerlés-kiváltotta felszabadulás vizsgálata esetén a kísérlet során kétszer, a 3. és a 13. frakcióban alkalmaztunk elektromos téringerlést (20 V, 2 Hz, 2 ms impulzus szélesség, 360 impulzus) egy Grass S88 stimulátor segítségével. Az anyagokat általában a 9. frakció után kezdtük adni, az ettől eltérő adagolást külön jelezzük. A nyugalmi felszabadulást vizsgáló kísérletekben 12-15, az elektromos ingerléses kísérletekben 19 frakciót gyűjtöttünk. A kísérletek végén az agyszeleteket 500 µl 10 %-os triklórecetsav

oldatba tettük és egy ultrahangos homogenizáló segítségével elroncsoltuk. A gyűjtött mintákból 500 µl-t, a szöveti homogenizátum felülúszójából 100 µl-t mértünk 2 ml szcintillációs koktéllhoz (Ultima Gold, Packard) majd egy Packard 1900TR típusú folyadékszintillációs mérőműszer segítségével meghatároztuk a keverékek radioaktivitását. Az aktivitást Bq/g-ban, illetve frakcionális release-ben (FR) adtuk meg. Az FR érték a minta radioaktivitásának és a minta gyűjtésének megkezdésekor a szövetben található radioaktivitás értéknek a hányadosa, százalékos formában kifejezve. Az adatok feldolgozását külön, a statisztikai módszerekkel foglalkozó fejezetben ismertetjük.

4.3. *In vitro* [^3H]monoamin felvétel mérése: szinaptoszóma (P₂) és szelet technika

4.3.1. Szinaptoszóma preparálás és transzmitter felvétel

A módszert a [^3H]DA és a [^3H]5-HT felvétel tanulmányozására használtuk (Szasz és mtsai, 2005). A hím Wistar patkányokat (140-180 g) dekapitáltuk, az agyat eltávolítottuk, a striatumot vagy hippocampust jég felett kipreparáltuk és 0.32 M szukróz oldatban homogenizáltuk teflon-üveg homogenizálóval. A homogenizátumot 1000 g-vel centrifugáltuk 10 percig, majd a felülúszót 12000 g-vel tovább centrifugáltuk 20 percig. Az így nyert üledéket (P₂ szinaptoszómális frakció) használtuk a transzmitter felvétel vizsgálatára. A szinaptoszómális pelletet karbogén gázzal (95% O₂ és 5% CO₂) buborékolatott Krebs-oldatban szuszpendáltuk (összetétele: 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 10 mM D-glükóz, 25 mM NaHCO₃, 10 µM pargyline és 0.3 mM aszkorbinsav, pH 7.4). Az alikvot mennyiségű szinaptoszóma preparátumot 5 percig preinkubáltuk a vizsgálandó anyagokkal (uptake gátló, DMPP) 37 °C-on, 500 µl-es végtérfogatban. A preinkubáció után a [^3H]DA-t vagy [^3H]5-HT-t 50 nM koncentrációban hozzáadtuk az oldatokhoz és az inkubáció további 5 percig folyt. A felvételt 3 ml jéghideg Krebs-oldat hozzáadásával állítottuk le, majd a mintákat 0.05 % polietiléniminnel átítatott GF/B típusú Whatman szűrőpapíron Brandel sejtszűrőn leszűrtük. A szűrőfiltereket Krebs-oldattal mostuk és a radioaktivitásukat Packard 1900TR típusú folyadékszintillációs mérőműszerrel határoztuk meg. A [^3H]DA ill. [^3H]5-HT specifikus felvételét a teljes és a nem specifikus (0 °C-on mért érték) felvétel különbségeként számoltuk ki.

4.3.2. Szelet preparátum és transzmitter felvétel

A módszert a [^3H]DA felvétel tanulmányozására használtuk (Kiss és mtsai, 2004). A hím Wistar patkányokat (140-180 g) dekapitáltuk, a striatumot jég felett kipreparáltuk majd 400 x 400 μm -es szeleteket készítettünk Bachofer szeletelőgéppel. A szeleteket 95% O_2 és 5% CO_2 gázkeverékkel buborékolatott, a szinaptoszóma preparálásnál ismertetett összetételű Krebs-oldatba helyeztük és azonnal felhasználtuk a kísérletekben. A [^3H]DA felvételét 1 ml végtérfogatban oxigénnel dúsított Krebs-oldatban mértük. A szeleteket 37 °C-on 15 percig előinkubáltuk. A felvételt 5×10^{-8} M (50 nM) [^3H]DA hozzáadásával indítottuk el, majd 10 perc inkubálás után 4 ml jéghideg Krebs-oldat hozzáadásával és Millipore cellulose szűrőn (0.8 μm) történő gyors vákumszűréssel állítottuk le. A szeleteket jéghideg Krebs-oldattal átmostuk, a szűrőkorongról összegyűjtöttük, majd 0.4 N HClO_4 oldatban homogenizáltuk. A homogenizátumot 15000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk 10 percig. Az üledéket 0.5 N NaOH -ban szuszpendáltuk és Lowry (1951) módszere szerint meghatároztuk a fehérjetartalmát. A felülúszót 1 M KHCO_3 oldattal neutralizáltuk, majd jeges hűtés után lecentrifugáltuk. A felülúszó radioaktivitását, mint a felvétel mértékét, Packard 1900TR típusú folyadékszintillációs mérőműszerrel, Packard Ultima Gold folyadék szcintillációs kórtél felhasználásával mértük. A specifikus [^3H]DA felvételt a teljes felvétel és a nem specifikus felvétel (0 °C-on mért érték) különbségeként, pmol/mg fehérje mértékegységben fejeztük ki.

4.4. [^3H]nisoxetin receptor kötési vizsgálat

A módszert a NET KO egerek tanulmányozásánál használtuk (Vizi és mtsai, 2004c). A 20-29 g súlyú egereket dekapitáltuk, és az agyat kiemeltük a koponyából jég felett. A frontális kérget illetve a hippocampust transzmitter felvételi és felszabadulási kísérletekben használtuk fel, a kéreg többi részét pedig -70 °C-on tároltuk a további felhasználásig. A membrán preparálásakor a -70 °C-on tárolt agykérget Ultra-turrax homogenizálóval homogenizáltuk 300 mM NaCl és 5 mM KCl tartalmú jéghideg 50 mM-os TRIS-HCl inkubációs pufferben (pH 7.4), majd 40 000 g-vel centrifugáltuk 15 percig. Az üledéket háromszor mostuk pufferrel és centrifugálással. A végső üledéket 30-szoros térfogatban (g/ml) szuszpendáltuk és azonnal felhasználtuk a kötődési kísérletekben. A szaturációs kísérletekben a membrán preparátum alikvot mennyiségét különböző koncentrációjú (0.1-1.7 nM) [^3H]nisoxetinnel inkubáltuk 4 °C-on 3 órán keresztül 250 μl végtérfogatú inkubációs

TRIS pufferben. A nem specifikus receptor kötést 10 μ M desipramin jelenlétében mértük. A receptor kötést a [3 H]nisoxetin hozzáadásával indítottuk el, és 0.05 % polietiléniminnel átitatott GF/B típusú szűrőpapíron történő gyors vákumszűréssel állítottuk le. A fehérje koncentrációt a Lowry-féle módszer módosított változatával határoztuk meg, CuEDTA felhasználásával. A disszociációs állandót (K_d) és a receptor sűrűséget (B_{max}), valamint az IC_{50} értékeket LIGAND programmal számoltuk ki.

4.5. Egész sejt patch clamp technika

4.5.1. Na^+ -áramok mérése patkány ganglion cervicale superior sejteken

A módszert a monoamin uptake gátlók Na^+ -csatornára kifejtett hatásának tanulmányozására használtuk (Hennings és mtsai, 1999). A méréseket apró módosításoktól eltekintve a korábban már leírtaknak megfelelően végeztük (Carrie és Ikeda, 1992), egész sejt patch clamp technika segítségével (Hamill és mtsai, 1981). A Na^+ -áramokat 20 másodpercenként váltottuk ki a tartófeszültség 20 ms-ig tartó, -80 mV-ról -20 mV-ra történő léptetésével. Az adatokat egy Axopatch 1D erősítővel (Axon Instrument, Foster City, CA) gyűjtöttük 20 kHz-es mintavételi gyakorisággal 5 kHz-es szűrés mellett. A szivárgó áramokat a standard P4 protokoll segítségével vontuk le. A patch pipetták (M87, Sutter Instruments, Novato) 1.8-3.5 M Ω ellenállásúak voltak, a soros ellenállást 70-80 %-ban kompenzáltuk. A patch elektródokat Na^+ -NMG alapú intracelluláris oldattal töltöttük fel (összetétele: NaCl; 30 mM, N-methyl-D-glucamine; 140 mM, $CaCl_2$; 1 mM, $MgCl_2$; 2 mM, HEPES; 10 mM, EGTA; 11 mM). Az idegsejteket Na^+ -TEA $^+$ alapú extracelluláris oldattal perfundáltuk (összetétele: NaCl 50 mM, TEACl 100 mM, $MgCl_2$ 10 mM, HEPES 10 mM). A vizsgálandó anyagokat az extracelluláris oldatban oldottuk fel. A 200 μ l térfogatú mérőkamrát folyamatosan perfundáltuk 2 ml/perc sebességgel. A vizsgált anyagokat legalább 2 percig adtuk. Az áramok amplitúdójának maximális értékét határoztuk meg (ld. 5.3. fejezet).

4.5.2. Na^+ -áramok mérése hippocampális sejttenyészeteken

A módszert a GBR-12909 (Mike és mtsai, 2003), illetve a desipramin és fluoxetin (Lenkey és mtsai, 2006) Na^+ -csatornákra kifejtett hatásának vizsgálatokor alkalmaztuk. A transzmembrán áramokat a standard egész sejt patch elvezetésben egy Axopatch 200B erősítő és a pClamp software (Axon Instruments, Foster City, CA) segítségével mértük. A kísérleteket szobahőmérsékleten (22-25 $^{\circ}$ C) végeztük. A boroszilikát pipettákat (1.4 - 4.4

MΩ) Sylgarddal (Dow-Corning, Midland, MI) borítottuk a kapacitancia csökkentése érdekében. A soros ellenállást több mint 80 %-ban kompenzáltuk. A pipettákat a következő intracelluláris oldattal töltöttük fel (mM-ban): CsCl 70, CsF 70, NaCl 2, HEPES 10, Cs-EGTA 10; a pH-t 7.3-ra állítottuk CsOH-dal. A külső oldat összetétele a következő volt (mM-ban): NaCl 140, KCl 5, CaCl₂ 2, glükóz 10, HEPES 5; a pH-t 7.3-ra állítottuk NaOH-dal. A Na⁺-áramokat a tartófeszültség gyors változtatásával váltottuk ki és a kiváltott válasz amplitúdójának nagyságával jellemeztük az egyes anyaghatásokat. Az ingerlési paramétereket ld. az 5.3.1. fejezetben.

4.5.3. NMDA-áramok mérése patkány kortikális sejtenyészeten

A módszert a fluoxetin és desipramin NMDA receptorokra gyakorolt hatásának vizsgálatakor alkalmaztuk (Szász és mtsai, 2007a). Az NMDA-áramokat a standard egész sejt patch elvezetésben egy Axopatch 200B erősítő és a pClamp software (Axon Instruments, Foster City, CA) segítségével mértük. A kísérleteket szobahőmérsékleten (22-25 °C) végeztük. A boroszilikát pipettákat (1.4 – 3.8 MΩ) Sylgarddal (Dow-Corning, Midland, MI) borítottuk a kapacitancia csökkentése érdekében. A soros ellenállást több mint 80 %-ban kompenzáltuk. A pipettákat a következő intracelluláris oldattal töltöttük fel (mM-ban): CsCl 70, CsF 70, NaCl 10, HEPES 10, Cs-EGTA 10; a pH-t 7.3-ra állítottuk CsOH-dal. A külső oldat összetétele a következő volt (mM-ban): NaCl 150, KCl 5, CaCl₂ 1.4, glükóz 10, HEPES 5; tetrodotoxin (TTX) 0.0003; picrotoxin 0.1; strychnine 0.002; glycine 0.01, a pH-t 7.3-ra állítottuk NaOH-dal. Az áramokat 2 kHz-en szűrtük egy beépített négy pólusú, alul áteresztő Bessel szűrő segítségével, a mintavételi frekvencia 10 kHz volt.

A kamraperfúziós kísérletekben egy számítógép által irányított, nyomás vezérelt anyagadó rendszert használtunk (DAD-12, Adams and List, Westbury, NY, U.S.A.). Ebben az esetben az NMDA-t (10 μM) ismételten adtuk 2 percenként –70 mV-os tartófeszültségen 1 másodperces időtartamban. Két kontroll áram után vagy további kontroll ingerléseket végeztünk, vagy a vizsgált anyagot perfundáltuk 12 percig, mely alatt 6 ingerlést végeztünk, majd a kimosás következett (8 perc, 4 ingerlés). A második kontroll áramot tekintettük 100 %-nak, és a további áramok amplitúdóját ennek százalékában fejeztük ki. A gátlási érték megállapításánál az adott ingerlést mindig a neki sorszámban megfelelő kontroll ingerléshez hasonlítottuk.

A gyors anyagadási vizsgálatoknál a két üvegapillárisból készített U-cső bemeneteit csatlakoztattuk a DAD-12-es anyagadó rendszerhez, a kimenetet pedig egy perisztaltikus pumpához kötöttük hogy a folyadékáramlást a lehető legprecízebben szabályozzuk. Az

anyagadást egy a pClamp szoftver által vezérelt, az adott U cső bemeneténél elhelyezett elektromos szelep zárásával oldottuk meg. Ez az elrendezés biztosította, hogy az anyagok 10-90 %-os hozzáadása illetve kimosása 2-10 ms-on belül megtörténjen, ahogy azt a junkciós potenciálok mérésével igazoltunk is. Az anyagok kimosási ideje független volt az anyag adásának időtartamától. Az alkalmazott protokollokat az 5. fejezetben ismertetjük részletesen.

4.6. *In vivo* transzmitterfelszabadulás mérés: mikrodialízis

4.6.1. DA felszabadulás mérése patkány striatumában

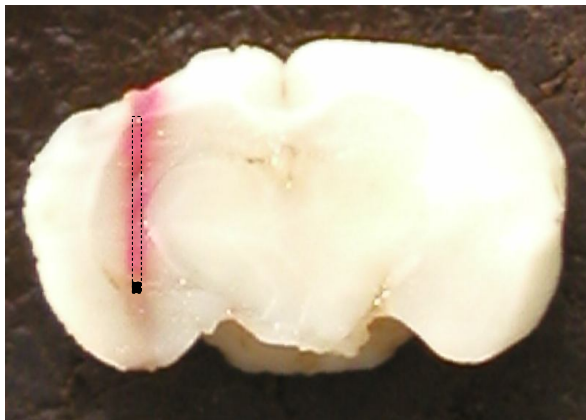
Műtét és mintagyűjtés. A módszert a nitrogén monoxid nyugalmi DA felszabadulásra gyakorolt hatásának vizsgálatakor használtuk (Kiss és mtsai, 1999). A hím Wistar patkányokat (280-350 g) uretánnal (1300 mg/kg) elaltattuk, majd sztereotaxikus készülékre (Stoelting, Kiel, USA) helyeztük és egy házi készítésű koncentrikus dialízis mintavevőt (polyacrylonitrile/sodium methallyl sulphonate kopolimer dializáló membrán, Hospal, Italy: i.d.: 0.22 mm, o.d.: 0.31 mm, aktív membrán hossz 5 mm) ültettünk az állat jobb striátumába (a bregmához viszonyított koordináták: A/P +2.0; M/L 3.0, D/V -8.0 a Paxinos és Watson sztereotaxikus atlasz alapján). A mintavevőt egy módosított Ringer-oldattal perfundáltuk (összetétele mM-ban: NaCl 147, KCl 4.0, CaCl₂ 1.2, MgCl₂ 1.0) 2.0 µl/perc sebességgel egy CMA 100 mikrodialízis pumpa segítségével (CMA Microdialysis, Solna, Svédország). A DA szint stabilizálódása után, általában 60 perccel a mintavevő beültetése után megkezdtük a 15 perces minták gyűjtését. Négy nyugalmi frakció után az állatok intraperitoneális injekció formájában kaptak L-NAME-t, D-NAME-t vagy az oldószer fiziológiás sóoldatot, majd a hatást további 60 percen (4 frakción keresztül) követtük nyomon. Mikor nomifensint is kapott az állat a mintavevőn keresztül 10 µM koncentrációban, a DA uptake gátlót a négy nyugalmi frakció eltelte után adtuk a dializáló oldathoz. Az új, megemelkedett DA szint általában 1 órán belül kialakult, de a stabilizáció érdekében a további i.p. kezelés csak 2 órával (8 frakcióval) a nomifensin adása után történt meg. Az L-NAME vagy fiziológiás oldat hatását 1 órán keresztül figyeltük (4 frakció). A testhőmérsékletet fűtőpárna segítségével 37 °C-on tartottuk az egész kísérlet folyamán. A kísérlet végén az állatokat túlaltattuk, az agyat egészben kivettük és formalinba helyeztük egy napra, majd a mintavevő elhelyezkedését sztereomikroszkópos vizsgálattal ellenőriztük. Csak azokat az adatokat használtuk fel, melyek esetén a mintavevő a megfelelő területen volt.

Mintaelemzés. A minták DA, dihidroxi fenilecetsav (DOPAC) és homovanillin sav (HVA) koncentrációját elektrokémiai detektorral kombinált nagy nyomású

folyadékkromatográfiás rendszerrel (HPLC-ECD) határoztuk meg, mely a következő elemekből állt: Waters M510 HPLC pumpa, Waters M460 elektrokémiai detektor glassy carbon munkaelektóddal (munkapotenciál +650 mV). Az adatokat a Maxima 820 kromatográfiás szoftver segítségével gyűjtöttük és elemeztük. Az elválasztást egy Hypersil ODS fordított fázisú oszlopon valósítottuk meg (Hewlett Packard, 5 μ m, 100 x 2.1 mm), melyen a mozgó fázist (0.15 M NaH_2PO_4 , 1.6 mM Na oktánszulfonsav, 1.0 mM Na_2EDTA és 12 % metanol, pH 3.7) 0.5 ml/perc sebességgel áramoltattuk. Ilyen körülmények között a DA detekciós limitje 1 pg/ minta körüli értéken mozgott.

4.6.2. NA felszabadulás mérése egér hippocampusában

Műtét és mintagyűjtés. A módszert a noradrenalin transzporter szerepét vizsgáló tanulmányban használtuk (Vizi és mtsai, 2004c). A mindkét nemhez tartozó NET KO, illetve WT egereket (28-30 g) pentobarbitállal (75 mg/kg, i.p.) elaltattuk és speciális egérfeltétell ellátott sztereotaxikus készülékre (Stoelting, Kiel, USA) helyeztük. Ezután egy házi készítésű, Spectrapor membránt (Spectrum, Houston, USA) tartalmazó, koncentrikus dialízis mintavevőt (o.d.: 0.2 mm, aktív membrán hossz 3.7 mm, molekuláris áteresztő képesség 6000 D) ültettünk az állat jobb hippocampusába (a bregmához viszonyított koordináták:



1. ábra. A mikrodialízis mintavevő pozíciójának ellenőrzése egér agyban. A kísérlet végén perfundált ruténium vörös festék jól láthatóan kirajzolta a mintavevő helyzetét a hippocampusban. Az eredményeket csak megfelelő elhelyezkedés esetén vettük figyelembe. Az ábrán látható profil a mintavevő méretarányos rajza.

AP -2.7, ML +3.5, DV-4.8, a Paxinos és Watson sztereotaxikus egératlasz alapján). A mintavevőt egy módosított Ringer-oldattal perfundáltuk (összetétele mM-ban: NaCl 147, KCl 4.0, CaCl_2 1.2, MgCl_2 1.0) 1.4 μ l/perc sebességgel egy CMA 100 mikrodialízis pumpa segítségével (CMA Microdialysis, Solna, Svédország). A 15 perces minták gyűjtését 60 perccel a mintavevő beültetése után kezdtük. A NA szint stabilizálódása után, mely tipikusan 6-7 minta legyűjtése után következett be,

az állatokat intraperitoneálisan kezeltük CH-38083-mal (10 mg/kg), és az anyag hatását további 60 percen keresztül vizsgáltuk. Bizonyos kísérletekben a NA szint stabilizálódása után a dializáló oldatot 1 μ M TTX-et tartalmazó oldatra cseréltük, és további 90 percig vizsgáltuk a NA szint alakulását. Az egyenletes anesztézia fenntartása érdekében két órával

az első pentobarbitál injekció után bizonyos kiegészítő mennyiségű (15-20 mg/kg) altatószert kaptak az állatok. A testhőmérsékletet fűtőpárna segítségével 37 °C-on tartottuk az egész kísérlet folyamán. A kísérlet végén az állatokat túlaltattuk, közben a mintavevőn keresztül ruténium vörös festéket perfundáltunk, ami elősegítette a lokalizáció vizsgálatát (1. ábra). Ezután az agyat egészben kivettük és formalinba helyeztük egy napra, majd a mintavevő elhelyezkedését sztereomikroszkópos vizsgálattal ellenőriztük. Csak azokat az adatokat használtuk fel, melyek esetén a mintavevő a megfelelő területen volt.

Mintaelemzés. A legyűjtött minták NA tartalmát azonnal meghatároztuk egy HPLC-ECD rendszer segítségével, mely a következő elemekből állt: Shimadzu LC-10ADVP pumpa (Shimadzu, Kyoto, Japan), egy 6 portos elektromos injektor (VALCO, Schenkon, Svájc), és egy Coulochem II elektrokémiai detektor (ESA, Chelmsford, USA) 5011-es nagy érzékenységgű analitikai cellával, melynek munkaelektrodjai -300 és +275 mV-ra voltak beállítva. A kromatogramokat a Maxima 820 kromatográfiás szoftver segítségével gyűjtöttük és elemeztük. Az elválasztást egy Supelco LC-18-DB (Supelco, Bellefonte, USA) fordított fázisú oszlopon valósítottuk meg (3 µm, 150 x 4.6 mm), melyen a mozgó fázist (0.15 M NaH₂PO₄, 1.6 mM Na oktánszulfonsav, 1.0 mM Na₂EDTA és 12 % metanol, pH 3.7) 1 ml/perc sebességgel áramoltattuk. Ilyen körülmények között a NA detekciós limitje 0.2-0.3 pg/ minta körüli értéken mozgott.

4.7. RT-PCR technika

A módszert a NET KO egerek vizsgálatánál használtuk (Vizi és mtsai, 2004c) a genetikai módosítás ellenőrzésére. A reverse transcriptase-polyclonal chain reaction (RT-PCR) technika alkalmas a NET KO és WT homozigóta, valamint a heterozigóta állatok genetikai tipizálására, így biztosíthatja a kísérletek megfelelő lefolytatását. A vizsgálatokhoz fiatal állatok farkából nyertünk mintát, melyből a DNS DNeasy Tissue Kit (Qiagen) felhasználásával került izolálásra. A kereskedelmiileg elérhető gén-specifikus primerek felhasználásával megvizsgálhattuk a NET gén illetve a genetikai módosítás során bejuttatott eGFP jelölő gén jelenlétét vagy hiányát. A PCR reakció egy GeneAmp PCR System 2700 berendezésben zajlott Promega Taq polimeráz (1U/30µl reakció keverék) segítségével. A PCR protokoll egy kezdeti 94 °C-on 5 percig tartó aktivációból állt, melyet 40 sokszorozó ciklus (94 °C 1 percig, 57 °C 1 percig majd 72 °C 1.5 percig) követett. A protokollt egy

végző elongációs periódus (72 °C 10 percig) zárta. A PCR termékeket 1 % agaróz gélen elemeztük etidium bromidos festési eljárással.

4.8. Statisztikai módszerek

Általános elvként törekedtünk a kísérleti adatok normalizálására, mely a biológiai mintákra oly jellemző nagy variancia kiküszöbölése illetve csökkentése révén gyakran könnyebben értelmezhetővé teszi a mérési eredményeket. Így a legtöbb kísérlet folyamán megkülönböztethetünk nyers adatokat és különböző normalizálási eljárásokkal előállított származtatott értékeket. Az alkalmazott módszerek egy része általánosan elfogadott az irodalomban, ezeket csak röviden ismertetjük, azonban az általunk kidolgozott új eljárás az elektromos ingerléses szeletkísérletek értékelésére nagyobb terjedelmet kapott. Ezen kívül részletesebben foglalkozunk az elektromos távolság Woodhull-modell szerinti meghatározásával, mivel az eljárás kevésbé elterjedt.

4.8.1. A nyugalmi monoamin felszabadulás eredményeinek feldolgoása szeletkísérletekben

Újításként a mikrodialízis kísérletekben már régóta alkalmazott eljárás szerint normalizáltuk az FR értékeket, azaz az anyagok adása előtti 3 frakció FR értékének átlagát 100%-nak véve, az összes frakció FR értékét ennek az átlagnak a százalékában fejeztük ki. A szöveti radioaktivitás tartalom meghatározása a szeletkísérletek során relatíve nagy bizonytalanságot vihet az adatfeldolgozásba, mivel a szövetek egy része a kísérlet során általában elvész, amit a gyakorlatban nem szoktak figyelembe venni. Mivel a FR értékek kiszámítása a szöveti tartalomra alapszik, a különböző kísérletekben gyakran igen nagy, nem biológiai okból származó eltérések mutatkoznak. A fent említett normalizálás és a normalizált FR értékek (nFR) használata ezt a hibát küszöböli ki és ezzel mintegy kontrasztosítja, kiemeli a biológiai eredetű különbségeket.

Az nFR adatokat a görbe alatti terület (A) számítási módszerével elemeztük. A DMPP dózis-hatás görbe esetén A-t az (1) egyenlet alapján számítottuk ki:

$$A = (\sum_{i=10-19} nFR_i)_{DMPP(c)} - (\sum_{i=10-19} nFR_i)_{DMPP(0)} \quad (1)$$

ahol i a frakciók sorszáma. A DMPP(c)-vel illetve DMPP(0)-val jelölt kifejezések a c koncentrációjú DMPP jelenlétében illetve a DMPP hiányában mérhető választ képviselik. Hasonló görbe alatti terület számításra alapuló módszert használtunk a nikotin illetve NMDA hatás értékelésekor.

Mivel a DMPP-re adott válasz kétfázisúnak bizonyult (ld. később az eredmények tárgyalásánál), a további kísérletekben a két fázis területét külön-külön határoztuk meg a (2) és (3) egyenletnek megfelelően:

$$A_{1. \text{ fázis}} = \sum_{i=10-14} nFR_i - 5 \cdot (nFR_{10} + nFR_{14}) / 2 \quad (2)$$

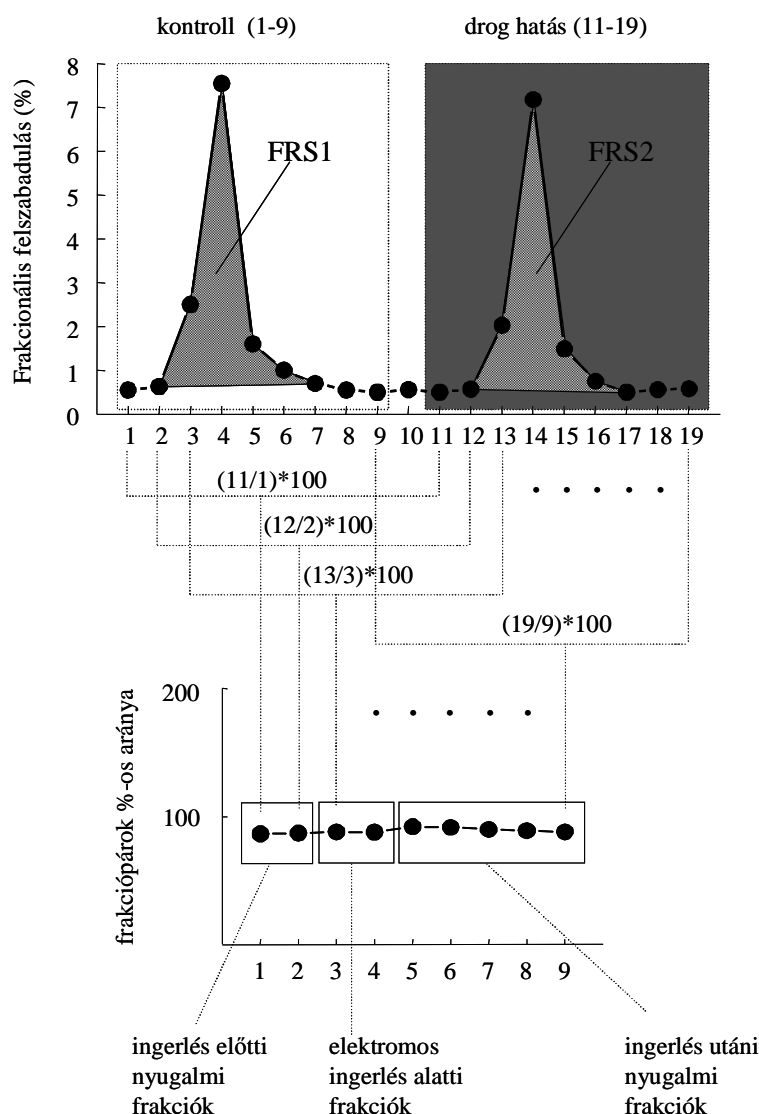
$$A - A_{1. \text{ fázis}} = A_{2. \text{ fázis}} \quad (3)$$

A közölt adatok 4-10 kísérlet átlagát és az átlag standard hibáját ($\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$) képviselik. A statisztikai elemzést ANOVA-t követő Dunnett teszt, illetve ANOVA-t követő Student-Newman-Keuls-féle többszörös összehasonlítás segítségével (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) végeztük.

4.8.2. Az elektromos ingerlés-kiváltotta monoamin felszabadulás eredményeinek feldolgozása szeletkísérletekben

Az elektromos ingerléses kísérletekben hagyományosan alkalmazott eljárás szerint a FR értékek felhasználásával kiszámítjuk a két ingerlésre, a vizsgált anyag hiányában (S_1) és jelenlétében (S_2), adott válasz görbe alatti területét, és az anyaghatást a két terület hányadosával jellemezzük (FRS_2/FRS_1). Ezt a számítási elvet alkalmaztuk például a NET KO állatokkal végzett kísérletekben A nikotin agonistákkal folytatott kísérleteket azonban az új eljárás segítségével értékeltük. A módszer azon alapszik, hogy az elektromos ingerléses kísérletekben gyakorlatilag kétszer egymás után, tükröképszerűen megegyező protokoll szerint végrehajtjuk ugyanazt a kísérletet, azaz két nyugalmi frakciót szedünk, majd a harmadikban elektromosan ingereljük a szövetet, ezután 6 ingerlés utáni nyugalmi frakciót gyűjtünk. Emiatt az 1. és 11., a 2. és 12., stb. frakció kölcsönösen megfeleltethető egymásnak (2. ábra). Mivel a kísérletek során 19 frakciót szedünk, 9 frakciópárt alakíthatunk ki. A 10. frakció páratlanul marad, ami kifejezett előnynek tekinthető, mert ez az a frakció, ahol az első ingerlés után általában a 8. frakciótól adott anyag (a rendszer holtterfogata miatt fellépő késéssel) elkezd elérni a szövetet. Ilyenformán ez a frakció átmeneti jellegűnek tekinthető.

Az új eljárásban az egymásnak megfelelő frakciók (frakciópárok) arányát tüntetjük fel százalékos formában ($100 \cdot 11/1$, $100 \cdot 12/2$, ..., $100 \cdot 19/9$). Az első két pont a nyugalmi felszabadulást, a 3-4. az elektromos ingerlést, a 5-9. az ingerlés utáni nyugalmi frakciókat (2.



2. ábra. Az elektromos ingerléses kísérletek hagyományos és új számítási módszerének összehasonlítása. Korábban az elektromos ingerlésre adott válaszok (FRS1, FRS2) görbe alatti területét számítottuk ki, és a drog hatást az $FRS2/FRS1$ aránnyal jellemeztük (felső panel). Az új módszer az egymásnak megfelelő frakciók arányát számítja ki, ezért a hatás időlefutására nézve is kapunk információt (a további részleteket ld. a 4.8.2. fejezetben).

ábra) jellemzi. Az ábrán egy kontroll kísérletet ábrázoltunk, azaz nem adtunk semmilyen anyagot a két ingerlés között. Látható, hogy ebben az esetben az új számítás szerint egy, az x-tengellyel párhuzamosan futó egyenest kapunk. Ez azért nagyon kedvező, mert minden anyaghatás az egyenestől való eltérésként jelentkezik, tehát sokkal szembeutóbb. A feldolgozási módszernek két nagy előnye van a korábbi eljárashoz képest. Egyrészt világosan láthatjuk az anyaghatás dinamikáját. A korábbi módszer területszámítási elve miatt elveszett a folyamat időbeli lefolyásával kapcsolatos

információ, míg az új eljárás érzékeny erre a paraméterre. Másrészt a korábbi eljárás során az elemzést végző személyen múlt, hogy a területszámításba mettől meddig terjedő frakció intervallumot foglal bele, ami meglehetősen szubjektívvá tette a feldolgozást. Az új számítási módszer ezt teljességgel kizárja. Az eredmények elemzésénél végezhetünk frakciónként összehasonlításokat, de a válasznak megfelelő frakciópárok összegzésével területszámítást is

alkalmazhatunk. Mi az előbbi módszer szerint elemeztük az adatokat ANOVA-t követő Dunnett teszt segítségével.

4.8.3. A mikrodialízis kísérletek eredményeinek feldolgozása

Itt a mikrodialízis eredmények értékelésénél általánosan elfogadott eljárást alkalmaztuk. A kezelés előtti három nyugalmi frakció monoamin tartalmának átlagát 100 %-nak tekintettük, és az összes frakció monoamin tartalmát ennek az átlagértéknek a százalékában fejeztük ki. A minták monoamin tartalmának abszolút értékét külön közöljük az eredmények ismertetésénél (5. fejezet). A statisztikai értékelést általában a normalizált értékekkel végeztük, az ábrázolt eredményeknél 4-8 kísérlet átlagát és az átlag standard hibáját (mean \pm S.E.M.) tüntettük fel. A statisztikai elemzésben ANOVA-t használtunk ismételt mérésekkel, post hoc tesztként pedig Dunnett tesztet vagy Tukey-Kramer féle többszörös összehasonlítást (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.8.4. A Woodhull-modell alkalmazása az elektromos távolság meghatározására

Az elektromos távolság értékét a Woodhull-modell egy speciális esetéből származtatott képlet segítségével határoztuk meg. Ebben az esetben az alapfeltételezés szerint a kötőhely csak az extracelluláris oldal felől elérhető (Woodhull, 1973):

$$I_{rel} = K_{(0mV)} / \{K_{(0mV)} + [B] * \exp(-z\delta FE / RT)\}$$

ahol I_{rel} egy bizonyos $[B]$ koncentrációjú antagonista jelenlétében mérhető áram relatív amplitúdója, $K_{(0mV)}$ a disszociációs állandó 0 mV-on, z a tesztelt antagonista ionvegyértéke; δ az elektromos távolság (a membránpotenciálnak a kötőhelyen elhelyezkedő antagonista által érzékelt hányada), F a Faraday állandó, R az egyetemes gázállandó, T az abszolút hőmérséklet, E pedig a membránpotenciál. Az elektromos távolságot a fenti egyenletnek a relatív áram amplitúdó-membránpotenciál adatpontokhoz történő illesztésével kaphatjuk meg.

A koncentráció-gátlás görbéket a Hill-egyenlethez illesztettük:

$$I = I_{contro} / [1 + ([D] / IC_{50})^{nH}]$$

ahol $[D]$ az anyag koncentrációja, IC_{50} a koncentráció, amely 50 %-os gátlást eredményez és nH a Hill-koefficiens. A statisztikai szignifikanciát ANOVA-t követő Tukey-Kramer többszörös összehasonlítással, vagy - ahol lehetséges volt - kétutas t-próbával határoztuk

meg. A feszültségfüggést a Pearson-féle korrelációanalízissel (Graphpad Instat) vizsgáltuk, a görbe illesztéseket a pClamp software-rel vagy az Excel Solver funkciójával végeztük.

4.9. Anyagok

A citalopram HBr a H Lundbeck A/S (Koppenhága, Dánia), a CH-38083 (7,8-methylenedioxy)-14- α -hydroxyalloberbane HCl) a Chinoin (Budapest), a pipecuronium bromid a Richter Gedeon (Budapest) ajándéka volt. A nomifensin maleátot Dr. Deák Ferenc (MTA KOKI, Budapest), az epibatidint Dr. Szántay Csaba (MTA KKKI, Budapest) szintetizálta. A GBR 12909-et, a nisoxtin HCl-et, a nikotin bitartarátot, az N^o-nitro-L-arginin metilésztert (L-NAME) és az N^o-nitro-D-arginin metilésztert (D-NAME), a sodium nitroprussidot (SNP), a tetrodotoxint (TTX), a picrotoxint, a dimetilfenilpiperazinium jodidot (DMPP), a mekamilamin HCl-t, a methyllycaconitine-t (MLA), az anatoxin-A HCl-t, a cytisint, a pargylin HCl-t, a pancuronium bromidot, a kadmium kloridot, az MK-801-et és az ifenprodilt a Sigmától (St Louis, USA), a desipramin HCl-t, a nisoxtin HCl-t, a xylazin HCl-t, a nomifensin maleátot és a 7-nitro indazolt (7-NI) az RBI-től (Natick, USA), a fluoxetin HCl-t, a sztrichnint, a glicint és az NMDA-t a Tocristól (Bristol, UK), a kokain HCl-t a Gyógyszerértékesítő Vállalattól (Budapest) szereztük be. Az L-7,8-[³H]noradrenalin ([³H]NA, specifikus aktivitás 30-50 Ci/mmol), a L-7,8-[³H]dopamin ([³H]DA, specifikus aktivitás 46 Ci/mmol), az L-[³H]szerotonint ([³H]5-HT, specifikus aktivitás 15.7 Ci/mmol) és az N-methyl-[³H]nisoxtint (specifikus aktivitás 84 Ci/mmol) az Amershamtól vásároltuk (Little Chalfont, UK). Minden egyéb felhasznált anyag analitikai tisztaságú volt. Az összes anyagot Krebs-oldatban, módosított Ringer-oldatban vagy fiziológiás sóoldatban oldottuk fel, kivéve a citalopramot, melyhez etanolt, illetve a 7-NI-t, melyhez propilén glikolt használtunk (1 mg/ml-es törzsoldat készítéséhez). Ezért a citalopramot illetve 7-NI-t használó kísérletekben a kontrollban is jelen volt az ekvimoláris mennyiségű oldószer is (ld. 5.1.1. fejezet).

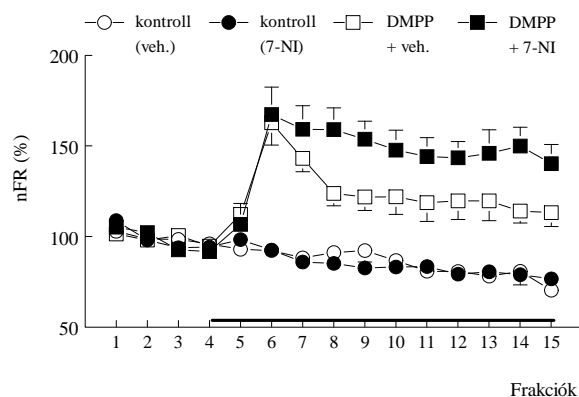
5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

5.1. A nitrogén monoxid szerepe a monoaminerg transzmisszió szabályozásában: a monoamin transzporterekre gyakorolt hatás jelentősége

A következő kísérletsorozatokban arra kerestük elsődlegesen a választ, hogy milyen hatása lehet a szervezetben termelődő, endogén (NO-nak a monoaminerg transzmisszióra, ezért azt az általános megközelítést alkalmaztuk, hogy a NOS enzim szelektív vagy nem szelektív gátlószereivel megakadályoztuk a NO szintézisét, és vizsgáltuk, hogy miként változik a monoamin felszabadulás különböző körülmények között. A kísérleti eredmények értelmezése során felmerülő, transzporterekre gyakorolt hatás lehetőségét striatum szeleteken végzett transzmitter felvétel segítségével vizsgáltuk.

5.1.1. Nitrogén monoxid hatása a nikotin agonisták által kiváltott NA felszabadulásra patkány hippocampus szeletekből

A 45 perces [^3H]NA-nal történő inkubálás, majd 60 perces preperfúzió után a szeletek 3687447 ± 156080 Bq/g ($n=47$) radioaktivitást tartalmaztak. A frakcionális felszabadulás



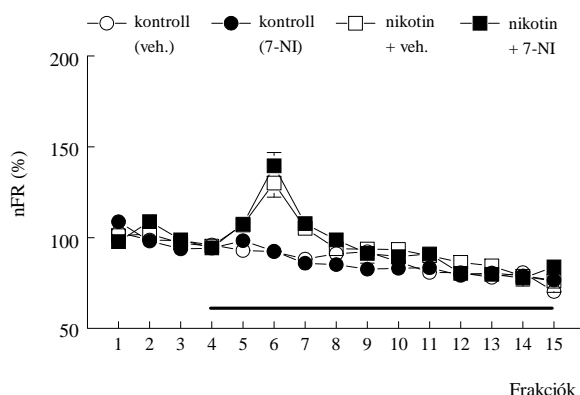
3. ábra. 7-NI hatása a DMPP-kiváltotta [^3H]NA felszabadulásra patkány hippocampus szeletekből. A DMPP-t (20 μM) a 4. frakciótól adtuk (vízszintes vonal), a 7-NI (40 μM) vagy oldószere, a propilén glikol (veh) a preperfúzió megkezdésétől jelen volt a médiumban. Minden pont 4-5 kísérlet átlagát és standard hibáját képviseli.

értéke nem volt szignifikánsan különböző egyik csoportban sem, az összes kísérletre számított átlagérték 0.49 ± 0.03 %/3 perc volt ($n=47$). A nikotin agonista DMPP-t és nikotint a negyedik frakciótól adtuk és jelen voltak a kísérlet végéig. Az adatok értékelésénél az adott válasz időbeli lefutásának megfelelő görbe alatti területet (AUC) határoztuk meg (DMPP-nél a 4-15, nikotinnál a 4-8 frakciók összegét). Az adatokat az

ANOVA-t követő Student-Newman-Keul-féle többszörös összehasonlítással elemeztük.

7-NI hatása a DMPP-kiváltotta [^3H]NA felszabadulásra. A DMPP 20 μM koncentrációban szignifikánsan növelte a NA felszabadulást ($\text{AUC}_{4-15} = 1370.99 \pm 86.86$ %, $n=5$) a kontroll csoporthoz viszonyítva ($\text{AUC}_{4-15} = 944.37 \pm 32.24$ %, $n=5$). Ezt a hatást erőteljesen potencírozta a szelektív neuronális NOS inhibitor 7-NI (3. ábra) 40 μM

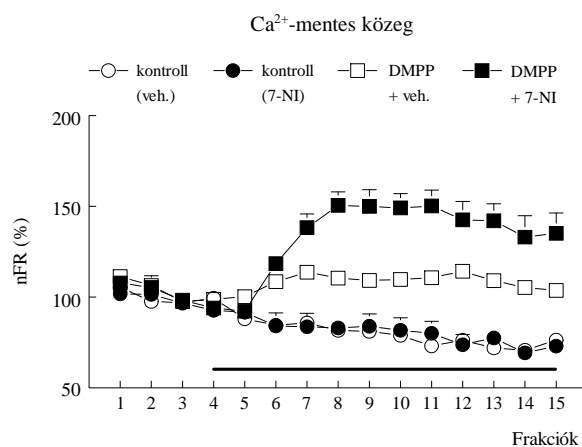
koncentrációban ($AUC_{4-15} = 1617.09 \pm 114.71 \%$, $n=5$) (DMPP vs. DMPP + 7-NI: $p<0.05$).



4. ábra. 7-NI hatása a nikotin-kiváltotta [^3H]NA felszabadulásra patkány hippocampus szeletekből. A nikotint ($100 \mu\text{M}$) a 4. frakciótól adtuk (vízszintes vonal), a 7-NI ($40 \mu\text{M}$) vagy oldószere, a propilén glikol (veh) a preperfúzió megkezdésétől jelen volt a médiumban. Minden pont 5 kísérlet átlagát és standard hibáját képviseli.

hippocampális NA felszabadulást, a következő kísérletekben azt kívántuk tisztázni, melyik mechanizmussal lép kölcsönhatásba a 7-NI.

7-NI hatása a nikotin-kiváltotta [^3H]NA felszabadulásra. A nikotin az 5.2.1. fejezet eredményei alapján csak a nikotin receptorok izgatása révén fokozza a hippocampális NA



5. ábra. 7-NI hatása a DMPP-kiváltotta [^3H]NA felszabadulásra patkány hippocampus szeletekből Ca^{2+} -mentes közegben. A DMPP-t ($20 \mu\text{M}$) a 4. frakciótól adtuk (vízszintes vonal), a 7-NI ($40 \mu\text{M}$) vagy oldószere, a propilén glikol (veh) a preperfúzió megkezdésétől jelen volt a médiumban. A Krebs oldat 1 mM EGTA-t is tartalmazott. Minden pont 4-6 kísérlet átlagát és standard hibáját képviseli.

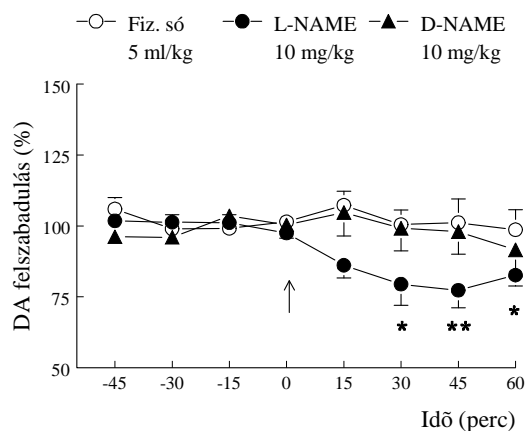
A 7-NI önmagában nem okozott semmilyen változást a nyugalmi NA felszabadulásban ($AUC_{4-15} = 926.46 \pm 27.49 \%$, $n=5$) és $10 \mu\text{M}$ -ban még nem potenciózta a DMPP hatását ($AUC_{4-15} = 1439.12 \pm 103.25 \%$, $n=4$). Mivel a DMPP az 5.2.2. fejezetben elmondottak szerint kettős hatással (1. fázis: nikotin receptor közvetítette exocitózis; 2. fázis NA transzporter megfordulása révén létrejövő carrier-közvetítette felszabadulás) fokozza a

felszabadulást, így alkalmas a DMPP 1. fázisú hatásának különálló tanulmányozására. A nikotin $100 \mu\text{M}$ -ban szignifikánsan fokozta a NA felszabadulást ($AUC_{4-8} = 531.64 \pm 20.76 \%$, $n=5$) a kontroll csoporthoz viszonyítva ($AUC_{4-8} = 460.52 \pm 2.83 \%$, $n=5$), ám ezt a hatást a 7-NI ($40 \mu\text{M}$) egyáltalában nem potenciózta ($AUC_{4-8} = 547.80 \pm 8.55 \%$, $n=5$) (4. ábra). Ismételten, a 7-NI önmagában semmilyen változást nem okozott a nyugalmi NA felszabadulásban ($AUC_{4-8} = 456.13 \pm 11.11 \%$, $n=5$).

7-NI hatása a DMPP-kiváltotta [^3H]NA felszabadulásra Ca^{2+} -mentes közegben. Az 5.2.2. fejezetben elmondottak szerint Ca^{2+} -mentes közegben a DMPP hatás 1. fázisa eltűnik, így lehetővé válik a 2. fázis elkülönített vizsgálata. Szemben a nikotinos eredményekkel, a DMPP-kiváltotta NA felszabadulást Ca^{2+} -mentes közegben ($\text{AUC}_{4-15} = 1195.11 \pm 13.61\%$, $n=5$) a 7-NI (40 μM) továbbra is potenciórozta ($\text{AUC}_{4-15} = 1501.65 \pm 97.67\%$, $n=5$) (5. ábra) (Ca^{2+} -free DMPP vs. Ca^{2+} -free DMPP + 7-NI: $p < 0.01$). A nyugalmi NA felszabadulás nem változott a DMPP-t nem kapó, hordozót ($\text{AUC}_{4-15} = 868.65 \pm 18.11\%$, $n=4$) illetve 7-NI-t ($\text{AUC}_{4-15} = 881.97 \pm 57.82\%$, $n=4$) tartalmazó kontroll csoportokban.

7-NI hatása a DMPP-kiváltotta [^3H]NA felszabadulásra Ca^{2+} -mentes közegben DMI jelenlétében. Kizárandó azt a lehetőséget, hogy a 7-NI az uptake carriertől független úton képes a DMPP 2. fázisának potenciózására, kísérleteinket elvégeztük a NA uptake gátló DMI jelenlétében is. Ca^{2+} -mentes közegben DMI (10 μM) jelenlétében a DMPP (20 μM) képtelen volt a nyugalmi NA felszabadulás befolyásolására (nincs ábrázolva), függetlenül a 7-NI (40 μM) jelenlététől ($\text{AUC}_{4-15} = 924.20 \pm 32.209\%$, $n=4$) vagy hiányától ($\text{AUC}_{4-15} = 869.50 \pm 23.39\%$, $n=4$).

5.1.2. Nitrogén monoxid hatása a nyugalmi DA felszabadulásra altatott patkány striatumában

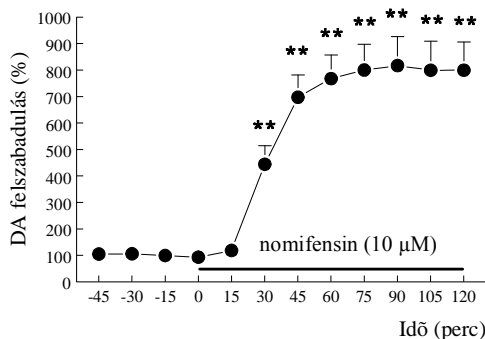


6. ábra. N ω -nitro-arginin metilészter (NAME) enantiomerjeinek hatása az *in vivo* nyugalmi DA felszabadulásra patkány striatumában. A fiziológias sóoldatot, L-NAME-t vagy D-NAME-t (10 mg/kg, i.p.) a 0. időpontban adtuk be (nyíl). A kezelések előtti 3 minta átlagát vettük 100 %-nak és az adatokat ehhez viszonyítva ábrázoltuk. Minden pont 4-6 kísérlet átlagát és standard hibáját képviseli. A statisztikai elemzésben ANOVA-t használtunk ismételt mérésekkel, melyet a Dunnett teszttel kombináltunk (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

A hordozóként használt fiziológias sóoldat ugyancsak nem befolyásolta a DA szintet a

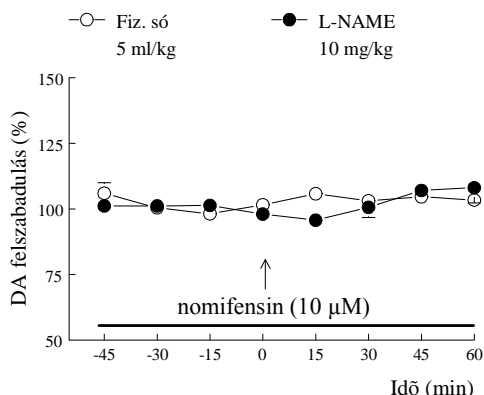
L-NAME és D-NAME hatása az *in vivo* nyugalmi DA felszabadulásra patkány striatumában. Normál körülmények között a nyugalmi DA felszabadulás az altatott patkány striatumában 12.3 ± 2.1 pg/minta volt. A nem-szelektív NOS gátló L-NAME szisztémás alkalmazása (10 mg/kg, i.p.) szignifikánsan csökkentette a DA extracelluláris koncentrációját (6. ábra). A csúcs hatás (23 % csökkenés) 30 perccel az injekció után következett be. Ezzel szemben az inaktív enantiomer D-NAME (10 mg/kg, i.p.) nem volt hatással a DA felszabadulásra (6. ábra).

striatumban. Egyik kezelés sem befolyásolta a metabolitok (DOPAC és HVA) extracelluláris koncentrációját (nincs ábrázolva).



7. ábra. Nomifensin (10 µM) hatása az *in vivo* nyugalmi DA felszabadulásra patkány striatumában. Az anyagot a 0. időpillanattól kezdtük adagolni a mintavetön keresztül. További részletek a 6. ábra magyarázatában találhatóak.

(7. ábra). Ilyen körülmények között az L-NAME (10 mg/kg, i.p.) nem befolyásolta a DA koncentrációt, és az oldószerként használt fiziológiás sóoldat (5 ml/kg) szintén hatástalan volt (8. ábra). Sem a nomifensin perfúziója, sem az egyéb kezelések nem befolyásolták a DOPAC és HVA szinteket (nincs ábrázolva).



8. ábra. L-NAME hatása az *in vivo* nyugalmi DA felszabadulásra patkány striatumában nomifensin jelenlétében. Az L-NAME-t (10 mg/kg, i.p.) a 0. időpontban adtuk be (nyíl), a nomifensint az injekció előtt két órával kezdtük adni a mintevetön keresztül. További részletek a 6. ábra magyarázatában találhatóak.

Ezzel szemben, mikor a szeleteket a NOS gátló L-NAME-val (100 µM) előinkubáltuk 15 percre, mintegy 80 %-os emelkedést (0.569 ± 0.072 pmol/mg protein/10 perc) tapasztaltunk a

L-NAME hatása az *in vivo* nyugalmi DA felszabadulásra patkány striatumában nomifensin jelenlétében. A DA visszavételi rendszer érintettségének vizsgálata céljából tanulmányoztuk az L-NAME hatását a DA transzporter gátló nomifensin jelenlétében is. Nomifensin folyamatos helyi alkalmazása (10 µM a mintavetön keresztül bejuttatva) közel nyolcszorosára emelte a nyugalmi DA koncentrációt és 60 perc elteltével stabilizálta ezen a magasabb szinten

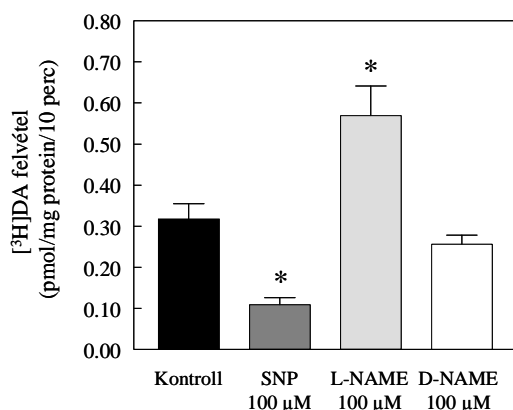
5.1.3. Nitrogén monoxid hatása a DA visszavételre patkány striatum szeletekben

A [^3H]DA specifikus felvétele 0.317 ± 0.038 pmol/mg protein/ 10 perc volt patkány striatum szeletekben 50 nM végső koncentráció alkalmazása mellett. Mikor a szeleteket 15 percre előinkubáltuk a NO donor SNP-vel (100 µM-os koncentrációban), a [^3H]DA felvétel szignifikánsan (66 %-kal) csökkent a 0.109 ± 0.017 pmol/mg protein/10 perc értékre.

[³H]DA visszavételben (9. ábra). Az inaktív enantiomer D-NAME (100 μM) nem befolyásolta szignifikánsan a [³H]DA visszavételt (0.256 ± 0.022 pmol/mg protein/10 perc).

5.1.4. Az eredmények értelmezése: az endogén nitrogén monoxid gátló hatása a monoamin tarnszporterek működésére

A neuronális NOS gátlás hatása a DMPP-kiváltotta NA felszabadulásra. A témakörben végzett első kísérleteink a nikotin agonisták noradrenerg transzmisszióra kifejtett hatásának tanulmányozásához kapcsolódtak. Mint látni fogjuk, ez a kérdéskör volt a gyökere



9. ábra. A NO donor sodium nitroprussid (SNP) és a NOS inhibitor N ω -nitro-arginin metilészter (NAME) enantiomerjeinek hatása a [³H]DA felvételre patkány striatum szeletekben. A szöveteket 15 percig inkubáltuk a különböző anyagokkal a mérés megkezdése előtt. Minden oszlop 4-6 független mérés átlagát és standard hibáját képviseli. Az adatokat ANOVA-t követő Dunnett teszttel elemeztük, *: $p < 0.05$ a kontrollhoz képest.

a disszertációban taglalt munka nagy részének, hiszen a nikotin agonisták és a monoamin transzporterek összefüggéseire (5.2. fejezet) is így bukkantunk, illetve ezt a vonalat folytatva jutottunk el a monoamin uptake gátlók nem-konvencionális központi idegrendszeri hatásaihoz (5.3. fejezet). Az eredeti témakör érdekességét az adta, hogy a nikotin kognitív funkciókat javító hatását csoportunk korábbi munkái összefüggésbe hozták a noradrenerg rendszerre gyakorolt serkentő hatásával (Vizi és mtsai, 1991; Vizi és mtsai, 1995; Sershen és mtsai, 1997). A DMPP-vel folytatott kísérletek idején még nem voltak ismertek a hippocampális szinaptoszóma preparátummal

folytatott vizsgálat adatai (Clarke és Reuben, 1996), így nem volt direkt bizonyíték arra, hogy a nikotin agonisták hatását közvetítő receptorok a noradrenerg terminálison helyezkednek el. Mivel a morfológiai adatok nem igazolták, hogy kolinerg rostok szinaptizálnának a noradrenerg rostokon (Umbriaco és mtsai, 1995), felmerült a lehetősége annak, hogy valamilyen egyéb nem-szinaptikus kapcsolat (Vizi, 1984; Vizi és Lábos, 1991) közvetíti a nikotin agonisták hatásait. Ismerve a NO fizikokémiai tulajdonságait (ld. később), kézenfekvő volt az a feltételezés, hogy a NO-nak lehet ilyen nem-szinaptikus mediátor szerepe. Erre alapozva kezdtük vizsgálatainkat a szelektív nNOS gátló 7-NI-vel (Babbedge és mtsai, 1993). Mint látni fogjuk, eredeti feltevésünk nem bizonyult igaznak, azonban a kísérletek eredményei és a további munka során igen érdekes összefüggésekre bukkantunk a NO és monoamin transzporterek működése között.

A NO lehetséges mediátor szerepét tanulmányozva azt találtuk, hogy a szelektív nNOS inhibitor 7-NI potenciózza a DMPP által kiváltott NA felszabadulást. Mivel a DMPP hatása két komponensű (ld. részletesen a 5.2. fejezetben), egy nikotin receptor közvetítette exocitózisból (1. fázis) és egy carrier-mediálta transzmitter felszabadulásból áll, olyan kísérleti viszonyokat igyekeztünk teremteni, melyekben a két komponens egymástól szétválasztva külön-külön vizsgálható, hogy megállapíthassuk melyikükkel képes kölcsönhatásba lépni a 7-NI. Az 1. fázist a nikotin segítségével tanulmányoztuk, mivel (hasonlóan a legtöbb nikotin agonistához, 5.2. fejezet) ez az anyag csak a nikotin receptorok izgatása útján fokozza a hippocampális NA felszabadulást. Mivel a nNOS gátló nem befolyásolta a nikotin hatására kialakuló választ, megállapíthatjuk, hogy a 7-NI nem a nikotin receptor közvetítette exocitózist fokozza. A 2. fázist Ca^{2+} -mentes közegben tanulmányozhatjuk elkülönítetten, mivel ilyenkor az 1. fázis eltűnik (5.2.2. fejezet). Ca^{2+} -mentes közegben a 7-NI továbbra is képes volt a DMPP-kiváltotta NA felszabadulás fokozására, ami azt mutatta, hogy a 7-NI feltételezhetően a carrier-mediálta komponens potenciózza. A NA uptake gátló jelenlétében folytatott kísérletek bizonyították, hogy a 7-NI hatásának támadáspontja valóban az uptake rendszer, hiszen DMI jelenlétében a potenciózó hatás is megszűnt (a DMPP hatásával egyetemben).

Felvetődik a kérdés, vajon a 7-NI potenciózó hatása nNOS gátló képességével vagy valamilyen egyéb hatásmechanizmussal magyarázható-e. MacKenzie és mtsai (1994) eredményei szerint a 7-NI $1.53 \pm 0.05 \mu\text{M}$ -os IC_{50} értékkel gátolta a hippocampusban a nNOS-t. A mi kísérleti adataink ($10 \mu\text{M}$ 7-NI még hatástalan volt, míg $40 \mu\text{M}$ -nál már világos potenciózó hatás jelentkezett) tökéletesen illeszkednek ezzel az adattal, különösen ha figyelembe vesszük, hogy MacKenzie-ék hippocampus szövet homogenizátum felülúszójából határozták meg az IC_{50} értéket. Ezzel szemben mi $400 \mu\text{M}$ vastagságú szeletekkel dolgoztunk, ahol a nNOS enzim elérhetősége nyilvánvalóan rosszabb, ezért valamivel magasabb 7-NI koncentráció szükséges a gátló hatás eléréséhez. Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy a 7-NI DMPP-kiváltotta NA felszabadulást potenciózó hatásának és nNOS gátló hatásának megjelenése között igen szoros korreláció áll fenn, ami arra utal, hogy a potenciózó hatás a nNOS gátlásának következménye.

Milyen hatása lehet hát a NO-nak a NA transzporterre? A kérdéssel kapcsolatban számos tanulmány látott napvilágot az elmúlt időszakban. A NO gátolta a $[^3\text{H}]\text{DA}$ (Lonart és Johnson, 1994; Pogun és mtsai, 1994a) és a $[^3\text{H}]\text{glutamát}$ visszavételét (Lonart és Johnson, 1994; Pogun és mtsai, 1994b), ugyanakkor fokozta a $[^3\text{H}]\text{5-HT}$ uptake-et (Miller és Hoffmann, 1994). A NA uptake-kel kapcsolatban, Pogun és mtsai (1994a) szerint a NO-nak

nincs hatása, míg Lonart és Johnson gátló hatásról számolt be (Lonart és Johnson, 1995). A fenti tanulmányokban a szerzők közvetlenül a transzmitter-felvételt mérték, általában szinaptoszóma preparátumokon NO generátorokból képződő, exogén NO jelenlétében. A mi kísérleteinkben az endogén eredetű NO képződés gátlásának következményeként tapasztaltunk funkcióváltozást a NA uptake működésében. A 7-NI hatására fokozódott a DMPP-kiváltotta carrier-mediálta NA felszabadulás, ami arra utal, hogy az endogén NO csökkenti az uptake rendszer aktivitását, legalábbis olyan körülmények között, amikor az uptake rendszer fordítva működik, azaz a sejtből kifelé szállítja a NA-t. Összefoglalva, eredményeink azt mutatják, hogy a nNOS által termelt endogén NO bizonyos körülmények között gátolni képes a NA uptake carriert és így fontos szerepet játszik a hippocampális noradrenerg rendszer működésének szabályozásában.

A NOS gátlás hatása a nyugalmi DA felszabadulásra és felvételre. Az elmúlt 20 évben nagy mennyiségű kísérleti megfigyelés halmozódott fel, ami azt mutatta, hogy a NO képes befolyásolni a dopaminerg ingerület-átvitelt a striatumban. Mindazonáltal, az eredmények meglehetősen ellentmondásosak, így nincs konszenzus a hatás jellegét illetően. Megfigyelték, hogy a NO donorok, illetve prekursorok növelik a DA felszabadulást patkány striatum szeletekből (Zhu és Luo, 1992; Lonart és Johnson, 1994), de a folyamat egyes tanulmányokban Ca^{2+} -függőnek (Lonart és mtsai, 1993), míg más munkákban Ca^{2+} -függetlennek bizonyult (Black és mtsai, 1994; Stewart és mtsai, 1996). Az *in vivo* mikrodialízis kísérletek adatai szintén ellentmondásosak. A NO donor S-nitrosoglutathion (SNOG) és sodium nitroprusside (SNP) növelte, míg a NO donor S-nitroso-acetilpenicillamin (SNAP) és a NO gáz csökkentette az extracelluláris DA szintet a striatumban (Guevara-Guzman és mtsai, 1994). Ezzel szemben egy másik mikrodialízis tanulmány szerint a SNAP, szinte teljesen azonos kísérleti körülmények között növelte a striatális DA felszabadulást (West és Galloway, 1996).

A NOS inhibitorokkal végzett kísérletek eredményei szintén nem egybehangzóak. Nagy koncentrációjú N^{ω} -nitro-L-arginin (NLA) lokális perfúziója a mintavevőn keresztül szignifikánsan csökkentette a striatális DA szintet altatott mongol ugróegérben (Strasser és mtsai, 1994). Ezzel szemben, egy másik NOS inhibitor, az L-NAME szintén a mintavevőn keresztül adagolva szignifikánsan emelte a DA koncentrációt altatott patkányban (Silva és mtsai, 1998). A szelektív neuronális NOS inhibitor 7-NI nem befolyásolta a nyugalmi DA felszabadulást patkányon folytatott mikrodialízis kísérletekben, de meggátolta a NO prekursor által kiváltott DA szint emelkedést (West és Galloway, 1997). Egy másik

tanulmányban viszont a 7-NI növelte a DA felszabadulást (Silva és mtsai, 1995). *In vitro* körülmények között az L-NAME szignifikánsan csökkentette az elektromos ingerléskiváltotta DA felszabadulást patkány striatum szeletekből (Sandor és mtsai, 1995). A NO-val kapcsolatos vizsgálatokban megfigyelhető, feltűnően sok ellentmondásos eredmény lehetséges okaival részletesen foglalkoztam egy összefoglaló munkában (Kiss, 2000). Itt, helyhiány miatt csak annyit jegyeznek meg, hogy számos tanulmányban igen magas (10-100 mM-os) koncentrációban alkalmazták a különböző anyagokat, mely koncentráció tartományban már ugrásszerűen megnő az aspecifikus hatások lehetősége (Kiss és mtsai, 1994), ami jelentősen nehezítheti az adatok helyes értelmezését.

Kísérleteinkben éppen ezért nem a mintavevőn keresztül, hanem szisztémásan adagoltuk a NOS inhibitor. Eredményeink szerint az L-NAME szignifikánsan csökkentette a striatális DA szintet, ami azt mutatja, hogy az endogén termelődő NO tónusos serkentő hatást fejthet ki a dopaminerg ingerület-átvitelre. Ez az eredményünk összhangban van korábbi megfigyelésekkel, melyek szerint az NMDA antagonistá MK-801 csökkenti a striatális DA szintet (Kashihara és mtsai, 1990; Whitton és mtsai, 1992), hiszen a NO termelődése NMDA receptorok aktiválódásához kapcsolódik (Schuman és Madison, 1994), tehát az NMDA antagonistáknak hasonló hatása lehet, mint a NOS inhibitoroknak.

Mi lehet a mechanizmusa a NO által kifejtett serkentő hatásnak? Mint azt már említettük, a NO vagy NO donorok gátolják a [³H]DA visszavételét (Lonart és Johnson, 1994; Pogun és mtsai, 1994a). Egy másik tanulmány szerint a NO alacsony koncentrációban növelte, míg magasabb koncentrációban gátolta a szinaptoszómális DA felvételt (Chaparro-Huerta és mtsai, 1997). Megfigyelték, hogy a NO donor-kiváltotta DA felszabadulást gátolja a DA uptake inhibitor nomifensin (Lonart és Johnson, 1994; Buyukuysal, 1997). Ezek az adatok azt mutatják, hogy a NO hatása a DA uptake rendszerrel összefüggésben alakul ki.

Saját eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a szervezetben képződő NO a DA transzporterre kifejtett gátló hatás révén emeli a DA koncentrációt. Az L-NAME megakadályozza a NO szintézisét, így megszünteti a gátló tónust, tehát a transzporter hatékonyabban tud működni, ami az extracelluláris DA szint csökkenését eredményezi. Nyilvánvaló, hogy a DAT gátló nomifensin felfüggeszti, mintegy maszkírozza, a NO által kifejtett hatást, hiszen már önmagában is teljes DAT funkció kiesést okoz. Feltételezésünket a striatum szeleten végzett uptake kísérletek megerősítik, hiszen a NO donor SNP csökkentette, míg a NOS gátló L-NAME növelte a [³H]DA visszavételét. Összegezve elmondhatjuk, hogy eredményeink szerint az endogén NO befolyásolhatja a DAT aktivitását, így fontos szabályozó tényezője lehet az extracelluláris DA szintnek.

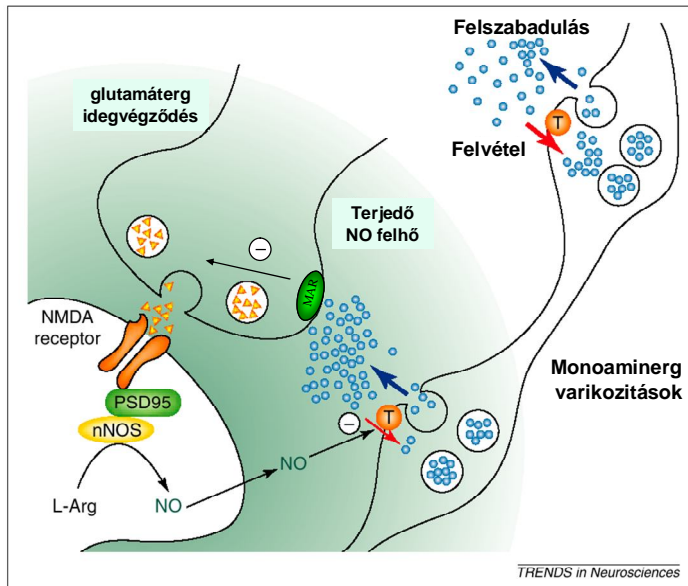
A nitrogén monoxid monoamin transzporterekre gyakorolt gátló hatásának mechanizmusa. A NA transzporter esetében tisztázódott a NO hatás molekuláris mechanizmusa. Kaye és mtsai (2000) kimutatták, hogy a NO donor SNAP szignifikánsan csökkenti a [³H]NA felvételt humán NET cDNS-sel transzfektált CHO sejtekben, azonban ez a hatás nem figyelhető meg, ha a 351-es pozíciójú ciszteint pont-mutációs eljárással szerinre cserélik. A további vizsgálatok tisztázták, hogy a cisztein(351) NO általi S-nitrozilálódása okozza a NA transzporter aktivitásának csökkenését. A DAT esetében hasonló mechanizmussal van dolgunk. Kimutatták, hogy a reaktív oxigén származékok (ROS), így pl. a peroxinitrit vagy a superoxid anion gátolni tudják a DA transzporter működését (Berman és mtsai, 1996; Fleckenstein és mtsai, 1997a; Page és mtsai, 1998). Noha a célpontokat nem azonosították egyértelműen, nagy valószínűséggel a transzporter extracelluláris loopjában található cisztein csoportok érintettek (Fleckenstein és mtsai, 1997b). Az eltérés a NET-hez képest annyi tehát, hogy itt nem a NO önmagában, hanem a belőle képződő ROS, elsősorban a peroxinitrit közvetíti a hatást. A mechanizmus egyben némi magyarázatot is ad a feltűnően sok ellentmondásos kísérleti adatra, ugyanis a NO illetve ROS képződés nagy mértékben függ az adott vizsgálati rendszer aktuális redox állapotától (pl. aszkorbinsav mennyisége, oxigenáltság, stb.), ami természetesen teljesen eltérő lehet a különböző kísérleti körülmények között. Mivel mind az S-nitroziláció, mind a peroxinitrit általi modifikáció reverzibilis folyamat, a jelenségeknek fontos élettani szerepe lehet a monoamin transzporterek aktivitásának szabályozásában.

5.1.5. A NO transzporterekre gyakorolt hatásának jelentősége: a receptorok nélküli nem-szinaptikus kommunikáció elmélete

Kísérleti adatainkból két igen fontos következtetés vonható le. Először, bizonyítottuk, hogy a NO monoamin transzporterekre gyakorolt gátló hatását nemcsak NO donorok segítségével lehet megfigyelni szinaptoszóma készítményeken, hanem NOS gátlók alkalmazásával is funkcionális *in vitro* és *in vivo* transzmitter felszabadulási kísérletekben. Tehát igazoltuk, hogy a szövetekben termelődő NO tónusos gátlást fejt ki a transzporterekre, így jelentősen befolyásolhatja az extracelluláris monoamin koncentrációt fiziológias körülmények között is. Másodszor, igazoltuk, hogy a NO gátló hatása független a transzporter aktuális működési irányától, hiszen megfigyelhető volt mind a nyugalmi DA felszabadulással kapcsolatban, mikor a transzporter a normál irányban kívülről befelé szállítja a transzmittert (Kiss és mtsai, 1999), mind a DMPP által indukált carrier-mediálta felszabadulás esetén, mikor megfordul a transzporter működése és a citoplazmából kifelé

szállítja a transzmittereket (Kiss és mtsai, 1996). De mi lehet ennek a gátló hatásnak a gyakorlati jelentősége?

Kapcsolat a NO szintézis és a glutamáterg transzmisszió között. A NO L-argininből képződik a NOS enzim segítségével, melynek legalább három különböző izoformája ismert (Griffith és Stuhr, 1995): az endoteliális (eNOS), mely a kardiovaszkuláris hatásokért felelős,



10. ábra. A neuronális NOS (nNOS) aktiválódása a központi idegrendszerben. A glutamát felszabadulása ingerületbe hozza az NMDA receptorokat, ami a következményes Ca^{2+} -beáramlás révén aktiválja a PSD-95 által a receptorhoz kötött nNOS-t. Az enzim által szintetizált NO felhőszerűen szétterjed és eléri az aktivált szinapszis környezetében található monoaminerg (NA, DA, 5-HT) varikozitásokat. Mivel az extracelluláris monoamin szint a felszabadulás és visszavétel eredőjeként alakul ki, a NO által a transzporterekre (T) gyakorolt gátló hatás megemeli az aktivált szinapszis környezetében a monoamin koncentrációt még akkor is, ha a felszabadulás nem változik. A megemelkedett monoamin szint a glutamáterg terminálisokon elhelyezkedő preszinaptikus monoamin receptorokon (MAR) keresztül csökkenteni képes a glutamát további felszabadulását, tehát a nemszinaptikus kölcsönhatások révén megvalósul egy negatív visszacsatolás (Kiss és Vizi, 2001 ábrája alapján)

A megfigyelések szerint a nNOS érdekes módon szinte kizárólag az NMDA receptorok aktiválódása után kezd a NO szintézisbe (Garthwaite és Boulton, 1995). Mivel a receptorok széles körére jellemző, hogy aktiválódásuk a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedéshez vezet, az NMDA receptorok és a NO szintézis szoros és kizárólagos kapcsolata meglehetősen rejtélyesnek tűnt egészen addig, míg a glutamáterg szinapszis molekuláris szerveződésének megismerése nem biztosított magyarázatot a jelenségre. Kiderült, hogy a nNOS szorosan kapcsolódik az NMDA receptorhoz a PSD-95 fehérje segítségével, így az enzim közvetlenül

az indukálható (iNOS), mely elsősorban immunológiai folyamatokban játszik szerepet és a neuronális (nNOS), mely az idegsejtekben fordul elő. Habár mindegyik izoforma megtalálható a központi idegrendszerben, a térbeli elhelyezkedés és az időbeli sajátságok miatt az ingerület-átvitelre kifejtett hatás elsősorban a nNOS által szintetizált NO-nak köszönhető.

Ez az enzim konstitutív és a neuronoknak csak 1-2 %-ában expresszálódik. A NO képződése calmodulin-függő folyamat, ezért a szintézis beindulásának elengedhetetlen előfeltétele az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) megemelkedése (Griffith és

az NMDA receptor aktiválódásakor megnyíló csatornán beáramló Ca^{2+} -ionok áramában helyezkedik el (Brenman és Bredt, 1997). Az egyéb forrásokból eredő Ca^{2+} -tranziensek feltételezhetően felhígulnak, elenyésznek, mire az enzim környezetébe érnének, ezért a nNOS-t csak az NMDA receptor képes 'bekapcsolni'. Ebből viszont az következik, hogy az endogén módon termelődő NO szintje az NMDA receptor/nNOS tartalmú szinapszisok körül meglehetősen hűen tükrözi a glutamáterg ingerület-átvitel aktivitását (10. ábra).

A NO a glutamát nem-szinaptikus 'meghosszabbításának' tekinthető. A glutamát a központi idegrendszer fő serkentő transzmittere. A monoaminokkal ellentétben a glutamát elsősorban a szinaptikus ingerület-átvitelben vesz részt, mivel a glutamáterg felszabadulási helyek (release site-ok) szinte kizárólag szinapszisokon belül helyezkednek el, míg a monoaminerg varikozitások döntő többsége szinaptikus kapcsolat nélkül, közvetlenül az extraszinaptikus térbe üríti a transzmittereket (Umbriaco és mtsai, 1995). Habár bizonyos mértékű szinaptikus kicsorgást leírtak a glutamáttal kapcsolatban is szobahőmérsékleten folytatott kísérletekben, ez az ún. spill-over teljesen eltűnt 37 °C-on a nagyon hatékony gliális glutamát felvétel miatt (Asztely és mtsai, 1997; Kullmann és Asztely, 1998; Semyanov és Kullmann, 2000). Ezek a megfigyelések is hangsúlyozzák a hőmérséklet kritikus szerepét a transzporterek működésében (Vizi, 1998). Mindenesre, még ha feltételezünk is bizonyos spill-overt normál testhőmérsékleten, a glutamát diffúziója mindenképpen erősen akadályozott a gliális és neuronális visszavétel miatt, így fiziológias körülmények között csak minimális mennyiségű glutamát hagyja el a szinapszist, és valószínűleg csak a közvetlen közelben elhelyezkedő periszinaptikus glutamát receptorokat éri el (Rusakov és mtsai, 1999).

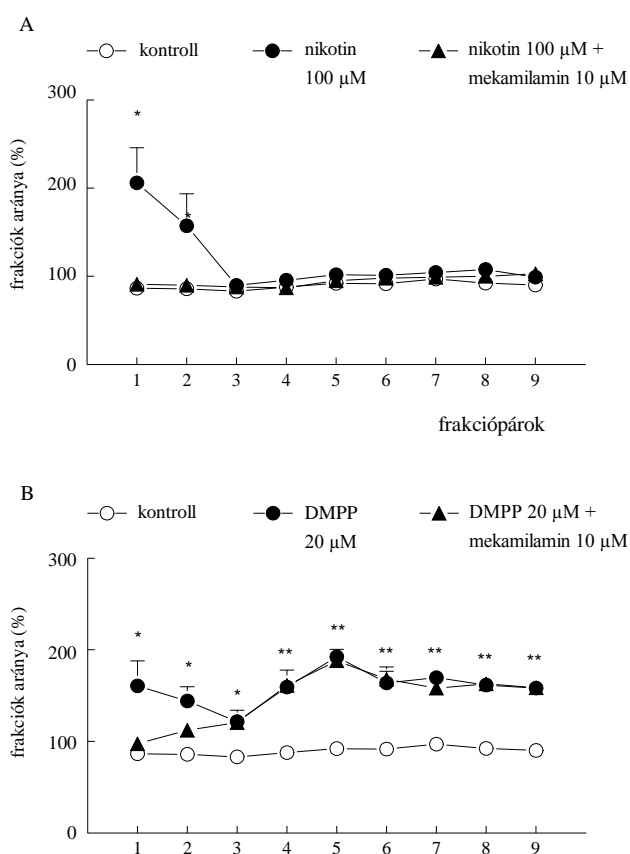
A NO ugyanakkor, fizikokémiai tulajdonságainak köszönhetően a nem-szinaptikus kölcsönhatások ideális közvetítője (Schulman, 1997; Vizi, 2000). A NO egy nagyon diffúzibilis gáz, ami akadálytalanul áthatol a biológiai membránokon. Habár felezési ideje csak néhány másodperc, még e rövid idő alatt is sejtszinten óriási, néhány száz μm -es távolságok megtételére képes (Gally és mtsai, 1990). Figyelembe véve a szinaptikus rés 20 nm-es szélességét vagy a sejttestek néhány μm -es méretét, világos, hogy a posztzinaptikusan elhelyezkedő nNOS által szintetizált NO nagyszámú sejt működését befolyásolhatja a szinapszis körüli térségben. A NO monoamin transzporterekre gyakorolt gátló hatása közvetítheti a glutamáterg transzmisszió aktivitását a környező monoaminerg sejteknek (10. ábra). Ez a hatás ugyanis a visszavétel akadályozásán keresztül megemeli a monoaminok extracelluláris szintjét az aktiválódott szinapszis körül, és éppen ez az emelkedés képviseli a monoaminerg rendszer válaszát a glutamáterg rendszer működésére. Így a NO segítségével a glutamát részt vehet nagyobb távolságokat áthidaló nem-szinaptikus kapcsolatokban is.

A NO hatás jelentősége: a receptorok nélküli nem-szinaptikus kommunikáció. A glutamáterg és monoaminerg rendszerek közötti kommunikációnak kulcsszerepe van bizonyos agyterületek működésének szabályozásában (gondoljunk csak a mozgáskoordinációra a striatumban, vagy a tanulási és memória feladatokra a hippocampusban). A monoaminerg rendszerek közös jellemzője, hogy a sejtestek kis kéreg alatti magvakban találhatók (pl. substantia nigra, locus coeruleus), de a hihetetlenül gazdag axon arborizáció nagy kiterjedésű agyterületeket idegez be diffúzan. A glutamát különböző módokon befolyásolhatja a monoaminok felszabadulását egy agyterületen belül. Először, a glutamáterg idegnyúlványok közvetlenül kapcsolatba léphetnek a monoaminerg varikozitásokkal ú.n. axo-axonikus szinapszisok segítségével. Ebben az esetben a glutamáterg szinapszis egyetlen, vagy maximum néhány varikozitás működését szabályozhatja nagy hatékonysággal. Másodszor, a glutamáterg sejtek nyúlványt küldhetnek közvetlenül a kéreg alatti magban elhelyezkedő monoaminerg sejtek sejtestjére. Ilyenkor az egész agyterületre kiterjedő, akár több százezer varikozitást érintő hatásokat fejthetnek ki. Végül harmadszor, a glutamáterg sejtek vetülhetnek közvetlenül a kérdéses agyterületen elhelyezkedő nNOS tartalmú sejtekre is. Ebben az esetben a NO felhő a szinapszis körüli néhány száz vagy ezer varikozitás működését befolyásolhatja. A transzporterekre gyakorolt hatás megemeli a monoaminok szintjét az aktiválódott szinapszis körül, ami gátolja a glutamát további felszabadulását a glutamáterg terminálisokon elhelyezkedő monoamin receptorokon keresztül (Scanziani és mtsai, 1993; Travagli és Williams, 1996; Calabresi és mtsai, 2000), így ez a NO-közvetítette kölcsönhatás egy negatív visszacsatolást tesz lehetővé.

A NO által közvetített kölcsönhatás igen különleges tulajdonsága, hogy a glutamáterg rendszerből származó információ, szemben az eddig ismert szinaptikus és nem-szinaptikus kölcsönhatásokkal, még akkor is el tudja érni a monoaminerg rendszert, ha ez utóbbi nem rendelkezik specifikusan a glutamátra érzékeny receptorokkal. A monoamin transzporterek ugyanis a monoaminerg sejtek saját fehérjéi, melyek a monoaminerg ingerület-átvitel normális működéséhez szükségesek, azonban a NO-közvetítette hatás révén alkalmassá teszik a monoaminerg sejteket egy másik transzmitter rendszerből érkező üzenet fogadására. Mivel a monoaminerg rendszerek ilyenformán válaszolni tudnak a glutamáterg rendszer aktivitásában beálló változásokra anélkül, hogy direkt módon beidegzést kapnának vagy specifikus glutamát receptorokat expresszálnának, a NO transzporterekre gyakorolt hatása egy új típusú sejtek közötti kommunikációt képvisel, a receptorok nélkül megvalósuló nem-szinaptikus kölcsönhatást.

5.2. Nikotin agonisták hatása a monoamin transzporterek működésére: a carrier-mediálta transzmitter felszabadulás lehetséges jelentősége

Ez a kutatási irányunk egy, a Gyógyszerkutató Osztályon már igen régóta folytatott témából, a nikotin központi idegrendszeri hatásainak vizsgálatából nőtte ki magát. Jól ismert az a tény, hogy a kolinerg rendszer és ezen belül a nAChR-ok fontos szerepet töltenek be a kognitív funkciókban. Az is ismert volt, hogy emellett a noradrenerg rendszernek is jelentős befolyása van ezekre az agyműködésekre, és a két rendszer kölcsönhatása magyarázhatja a



11. ábra. Nikotin agonisták hatása az elektromos ingerlés-kiváltotta [³H]NA felszabadulásra patkány hippocampus szeletekből. A: nikotin, B: DMPP. Az első két frakció a stimulálás előtti, a második kettő az elektromos ingerlés alatti, az utolsó öt pedig az ingerlés utáni frakciókat képviseli (ld. 2. ábra). Az anyaghatást a kezeltetlen kontrollhoz hasonlítottuk ANOVA és azt követő Dunnett teszt segítségével (* p < 0.05, ** p < 0.01).

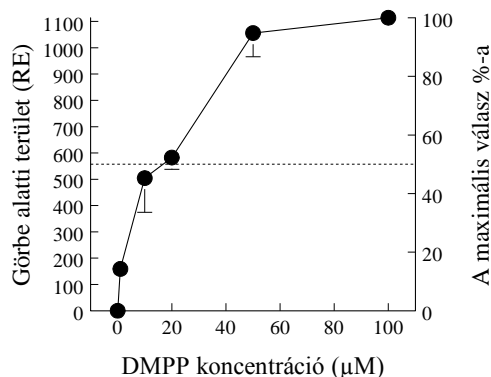
fejezetben leírtak szerint, a frakciópárok módszerével végeztük. A nikotin agonisták a NA felszabadulásra kifejtett hatásuk alapján élesen elkülönültek két csoportra. A nikotin (100 μM), az anatoxin-a (2 μM), a cytisin (30 μM) és az epibatidin (1 μM) egymáshoz teljesen

dohányzás (során bejutó nikotin) kognitív működéseket javító hatását. Ezért vizsgálta munkacsoportunk a nikotin és nikotin agonisták nordarenerg transzmisszióra gyakorolt befolyását (Vizi és mtsai, 1991; Vizi és mtsai, 1995; Sershen és mtsai, 1997). E munka során tűnt fel, hogy a DMPP eltérően viselkedik a többi nikotin agonistától, és ezért kezdtünk egy alaposabb elemző munkába.

5.2.1. Nikotin agonisták hatása az elektromos ingerlés-kiváltotta NA felszabadulásra patkány hippocampus szeletekből

Az összes kísérlet első frakcióiból számított nyugalmi [³H]NA felszabadulás 2763±184 Bq/g volt (n=52), azaz a teljes trícium-tartalom 0.59±0.04 %-a szabadult fel a 3 perces gyűjtési periódus alatt. Az eredmények feldolgozását a 4.8.2.

hasznló módon csak a nyugalmi felszabadulást befolyásolta, méghozzá oly módon, hogy az anyag adása után rögtön megnőtt a nyugalmi release. Ezt követően a hatás gyorsan lecsökkent, és az elektromos ingerlés alatti és utáni frakciókban már teljesen eltűnt



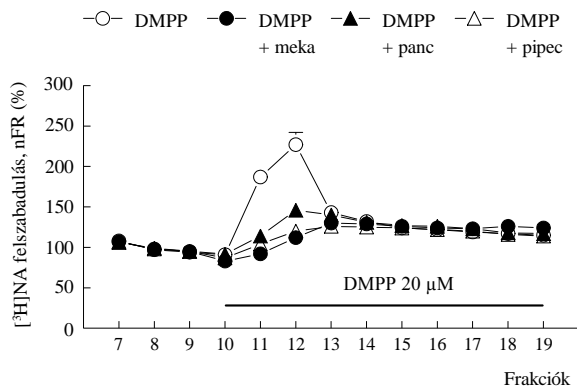
12. ábra. A DMPP [^3H]NA felszabadulásra gyakorolt hatásának dózis-hatás görbéje. Mivel a DMPP 20 μM -ban adta a maximális válasz 50 %-át (EC_{50}), a további kísérletekben ezzel a koncentrációval dolgoztunk. Minden pont 4-6 kísérlet átlagát és standard hibáját képviseli

felszabadulásra kifejtett hatásuk alapján. Az egyik a nikotinnal fémjelzett csoport, melynek tagjai teljes mértékben antagonisták érzékeny hatással rendelkeznek, csak a nyugalmi felszabadulást növelik és nem fokozzák az elektromos ingerlés-kiváltotta NA felszabadulást. A másik csoportot a DMPP képviseli, mely anyag antagonistákra inszenzitív módon is fokozza az ingerlés-kiváltotta NA felszabadulást. Mivel a fenti eredmények alapján a DMPP hatása tűnt a legkomplexebbnek, a következő kísérletsorozatban a DMPP-kiváltotta NA felszabadulásban szerepet játszó mechanizmusokat kívántuk vizsgálni.

5.2.2. A DMPP nyugalmi NA felszabadulásra kifejtett hatásának jellemzése DMPP hatása a hippocampus szeletekből mért nyugalmi [^3H]NA felszabadulásra.

A 45 perces [^3H]NA-nal történő inkubálás, majd 60 perces preperfúzió után a szeletek radioaktivitás tartalma 3124771 ± 127590 Bq/g ($n=74$) volt. Radiokémiai detektálással kombinált nagynyomású folyadék-kromatográfiás rendszer segítségével igazoltuk, hogy a felszabaduló trícium döntő többsége (több mint 80 %-a) [^3H]NA-nak felelt meg. A DMPP 1, 10, 20, 50 és 100 μM koncentrációban adva dózis-függő módon fokozta a NA felszabadulást (12. ábra). Mivel a DMPP 20 μM -os koncentrációban mutatta a csúcshatás 50 %-át, a további

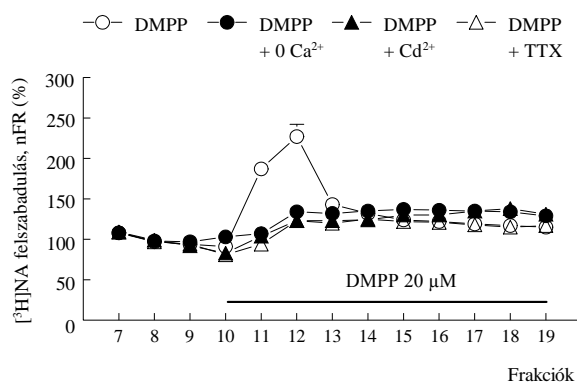
(11A. ábra), a jobb érthetőség kedvéért csak a nikotin hatást tüntettük fel). Ezzel szemben a DMPP (11B. ábra) esetén az ingerlés előtti, alatti és utáni frakciókban is tapasztalható volt a felszabadulás fokozódása. Jellemző volt a nikotin antagonisták hatása is. Míg a nikotin, anatoxin-a, cytisin és epibatidin esetén a mekamilamin (10 μM) teljes mértékben gátolta az agonisták hatását (11A. ábra), addig a DMPP esetén csak a nyugalmi frakciónál volt megfigyelhető szignifikáns csökkenés (11B. ábra). Az eredmények alapján úgy tűnt, hogy az általánosan használt nikotin agonisták legalább két csoportba sorolhatók a NA



13. ábra. Különböző nikotin receptor antagonisták hatása a DMPP-kiváltotta $[^3\text{H}]\text{NA}$ felszabadulásra patkány hippocampus szeletekből. Rövidítések: DMPP: DMPP 20 μM ; meka: mekamilamin 10 μM ; panc: pancuronium 10 μM ; pipe: pipecuronium 10 μM . Minden pont 4-6 kísérlet átlagát és standard hibáját képviseli.

kísérletekben a nikotin receptorok szerepét kívántuk vizsgálni a DMPP-kiváltotta NA felszabadulásban. Eredményeink azt mutatták, hogy a DMPP hatása kétfázisú. Míg a csúcs válasz (1. fázis) tökéletesen gátolható volt mekamilaminnal (10 μM), pancuroniummal (10 μM) illetve pipecuroniummal (10 μM), addig a farki választ (2. fázis) nem befolyásolták ezek az anyagok. A nikotin antagonisták jelenlétében a NA felszabadulás növekedése lassan indult meg, és elérve a farki válaszra jellemző mértéket stabilizálódott a kísérlet folyamán (13. ábra, 1. táblázat).

Ca^{2+} -mentes médium, Cd^{2+} , és TTX hatása a DMPP-kiváltotta $[^3\text{H}]\text{NA}$



14. ábra. Különböző, excitózist befolyásoló szerek hatása a DMPP-kiváltotta $[^3\text{H}]\text{NA}$ felszabadulásra patkány hippocampus szeletekből. Rövidítések: DMPP: DMPP 20 μM ; 0 Ca^{2+} : Ca^{2+} -mentes médium + 1 mM EGTA; Cd^{2+} : Cd^{2+} 125 μM ; TTX: tetrodotoxin 1 μM . Minden pont 4-6 kísérlet átlagát és standard hibáját képviseli.

hatását a DMPP-kiváltotta $[^3\text{H}]\text{NA}$ felszabadulásra. Eredményeink szerint mindhárom

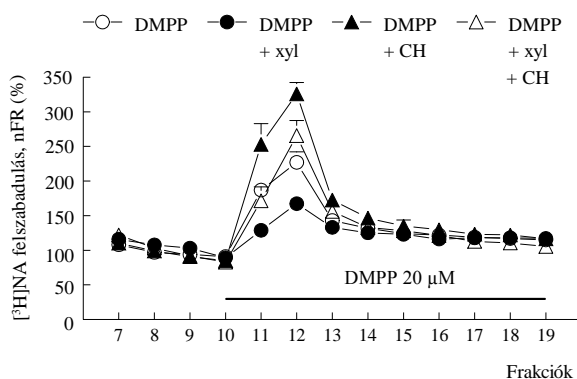
kísérletekben ezzel a koncentrációval dolgoztunk. A DMPP hatására kialakuló választ dinamikailag egy hirtelen kiugrást követő gyors visszaesés (csúcs válasz) jellemezte, melyet egy tartós emelkedett NA felszabadulás követett (farki válasz), ami szignifikánsan magasabb volt, mint a spontán NA felszabadulás (13. ábra).

Nikotin antagonisták hatása a DMPP-kiváltotta $[^3\text{H}]\text{NA}$ felszabadulásra. Ezekben a

felszabadulásra. A következőkben jellemezni kívántuk a DMPP hatására fellépő NA felszabadulásban résztvevő mechanizmusokat. A vezikuláris exocitózis sajátossága, hogy Ca^{2+} -függő és általában akciós potenciálok kialakulásának következménye, ezért vizsgáltuk a Ca^{2+} -mentes közeg (1 mM EGTA jelenlétében), az aspecifikus Ca^{2+} -antagonista Cd^{2+} (125 μM), valamint a Na^+ -csatorna blokkoló TTX (1 μM)

kezelés teljes mértékben meggátolta az 1. fázis kifejlődését, de nem befolyásolta, illetve a Ca^{2+} -mentes közeg potenciórozta a 2. fázis megjelenését (1. táblázat). A válasz dinamikájában a nikotin antagonistáknál látottakhoz volt hasonló, azaz a lassú kifejlődés után emelkedett maradt egészen a kísérlet végéig (14. ábra).

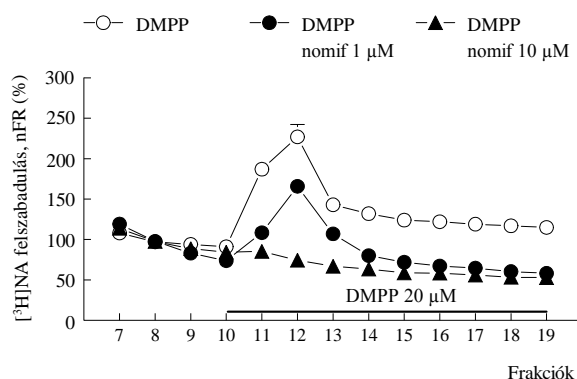
α_2 -agonisták és antagonisták hatása a DMPP-kiváltotta $[^3\text{H}]\text{NA}$ felszabadulásra. A



15. ábra. Különböző α_2 -adrenoceptorra ható szerek hatása a DMPP-kiváltotta $[^3\text{H}]\text{NA}$ felszabadulásra patkány hippocampus szeletekből. Rövidítések: DMPP : DMPP 20 μM ; xyl : xylazín 3 μM ; CH : CH-38083 2 μM . Minden pont 4-6 kísérlet átlagát és standard hibáját képviseli.

kísérletekkel arra kerestük a választ, modulálható-e preszinaptikusan a DMPP-kiváltotta $[^3\text{H}]\text{NA}$ felszabadulás. Az α_2 -agonista xylazín (3 μM) szignifikánsan csökkentette az 1. fázist. A hatást kivédte az α_2 -antagonista (\pm)-CH-38083 (2 μM). Az utóbbi anyag önmagában szignifikánsan növelte az 1. fázist. Az α_2 -adrenoceptorra ható anyagok egyike sem befolyásolta a 2. fázist (15. ábra, 1. táblázat).

NA uptake gátlók hatása a DMPP-kiváltotta $[^3\text{H}]\text{NA}$ felszabadulásra. Ezekben a



16. ábra. A NA uptake gátló nomifensin hatása a DMPP-kiváltotta $[^3\text{H}]\text{NA}$ felszabadulásra patkány hippocampus szeletekből. Rövidítések: DMPP : DMPP 20 μM ; nomif.: nomifensin. Minden pont 4-6 kísérlet átlagát és standard hibáját képviseli.

kísérletekben a NA uptake carrier lehetséges szerepét vizsgáltuk a DMPP-kiváltotta $[^3\text{H}]\text{NA}$ felszabadulásban. A DMI (1 és 10 μM) tökéletesen gátolta mindkét fázist. (1. táblázat). A nisoxtin szignifikánsan csökkentette mindkét fázist 1 μM -os koncentrációban, míg tökéletesen gátolta a válaszokat 10 μM -ban (16. ábra, 1. táblázat). A nomifensin teljes mértékben gátolta

mindkét fázist 10 μM -os koncentrációban, de alacsonyabb koncentrációban (1 μM) csak a 2. fázist gátolta és nem érintette az 1. fázist (1. táblázat). Mivel a DMI-re és nisoxtinre kapott görbék gyakorlatilag ugyanúgy néznek ki, mint a 10 μM nomifensin esetén kapott válasz, ezért a 16. ábra csak a nomifensines eredményeket mutatja be.

1. táblázat. Különböző szerek hatása a DMPP-kiváltotta [³H]NA felszabadulásra patkány hippocampus szeletekből

	1. fázis	2. fázis
DMPP (20 µM)	231.36 ± 18.91	359.79 ± 27.95

NICOTIN RECEPTOR ANTAGONISTÁK

pipecuronium (10 µM)	40.97 ± 4.35**	330.32 ± 16.64
pancuronium (10 µM)	75.09 ± 10.76**	371.73 ± 37.26
mekamilamin (10 µM)	24.88 ± 4.94**	358.59 ± 33.33

EXOCITÓZIST BEFOLYÁSOLÓ SZEREK

Ca ⁺⁺ -free medium	24.24 ± 10.03**	472.24 ± 22.84*
Cd ⁺⁺ (125 µM)	48.92 ± 20.24**	385.00 ± 55.84
TTX (1 µM)	38.25 ± 3.52**	311.07 ± 33.36

PRESZINAPTIKUS MODULÁCIÓRA HATÓ SZEREK

xylazin (3 µM)	116.88 ± 20.49*	333.60 ± 27.69
xylazin (3 µM) + CH-38083 (2 µM)	279.12 ± 39.27	323.06 ± 86.56
CH-38083 (2 µM)	413.24 ± 37.52*	411.33 ± 27.64

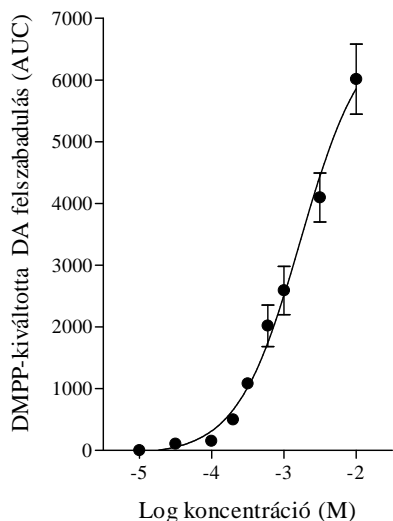
MONOAMIN UPTAKE GÁTLÓK

desipramin (1 µM)	15.43 ± 3.18**	-52.92 ± 38.15**
desipramin (10 µM)	3.86 ± 2.24**	-149.52 ± 8.74**
nisoxtin (1 µM)	37.49 ± 13.71**	89.96 ± 57.66**
nisoxtin (10 µM)	20.27 ± 4.17**	-129.49 ± 32.33**
nomifensin (1 µM)	159.65 ± 37.06	-88.34 ± 13.79**
nomifensin (10 µM)	13.88 ± 3.34**	-146.93 ± 45.94**

A két fázis görbe alatti területét a 4.8.1. fejezetben ismertetettek szerint számoltuk ki. Az ED₅₀ értéknek megfelelő 20 µM-ban adott DMPP hatását tekintettük kontrollnak, és a különböző kezelésekre adott válaszokat ehhez hasonlítottuk ANOVA-t követő Dunnett teszt segítségével (* p < 0.05, ** p < 0.01).

5.2.3. A DMPP nyugalmi DA felszabadulásra kifejtett hatásának jellemzése

DMPP hatása a striatum szeletekből mért nyugalmi [^3H]DA felszabadulásra. A 45 perces [^3H]DA-nal történő inkubálás, majd 60 perces preperfúzió után a szeletek radioaktivitás tartalma 212477 ± 12759 Bq/g ($n = 63$) volt. A DMPP dózis-függő módon

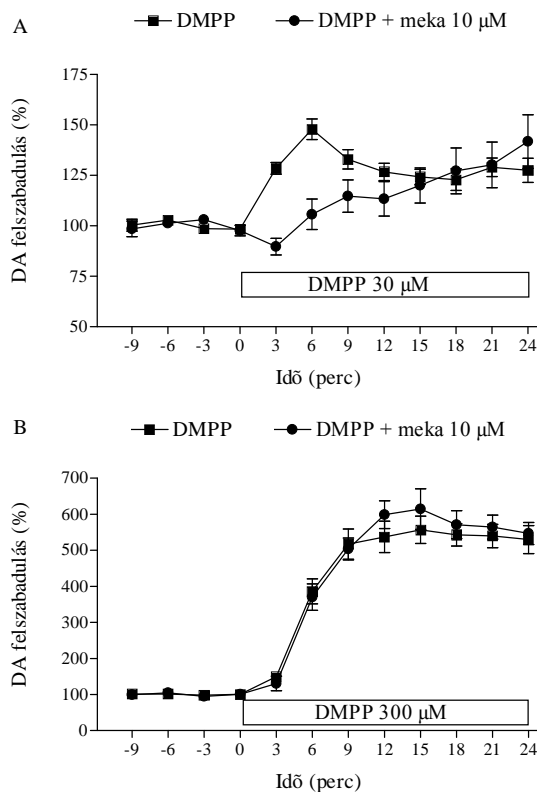


17. ábra. DMPP hatása a nyugalmi [^3H]DA felszabadulásra patkány striatum szeletekből. A választ a Módszerek fejezetben ismertetett görbe alatti terület számítással határoztuk meg. Minden pont 5-8 független kísérlet átlagát és standard hibáját képviseli. Az EC_{50} értéket nem-lineáris regresszióval határoztuk meg.

emelte a striatalis [^3H]DA felszabadulást (17. ábra), azonban a hatás nem érte el a maximumát még a legmagasabb alkalmazott koncentráció (10 mM) esetén sem. A válasz időlefutása az alkalmazott DMPP koncentrációtól függött. Magasabb, 100 μM feletti koncentráció esetén a felszabadulás fokozatosan nőtt, majd 3-4 frakción belül stabilizálódott. Ennél alacsonyabb koncentráció esetén kétfázisú, a NA-nál tapasztalhatóhoz hasonló választ láthattunk: egy gyors emelkedés és csökkenés (csúcs válasz, 1. fázis) után egy tartós és állandó felszabadulás fokozódás volt megfigyelhető (farki válasz, 2. fázis). Ez a kétfázisú válasz 30 μM DMPP esetén volt a legmarkánsabb, ezért a továbbiakban ezzel a koncentrációval dolgoztunk. A magasabb koncentrációknál tapasztalható egyfázisú választ 300 μM DMPP felhasználásával elemeztük.

Nikotin antagonisták hatása a DMPP-kiváltotta [^3H]DA felszabadulásra. A nikotin receptorok lehetséges szerepét a DMPP-kiváltotta DA felszabadulásban az igen hatékony, nem szelektív nikotin receptor antagonisták mekamilamin és az $\alpha 7$ alegységekből álló nikotin receptorokra szelektív antagonisták MLA segítségével vizsgáltuk. A striatumban az alacsony koncentrációjú (30 μM) DMPP-vel kiváltott [^3H]DA felszabadulást részben gátolta a mekamilamin (10 μM). A gátló hatása a csúcs válaszra koncentrált, hiszen az 1. fázist teljesen megszüntette, míg a 2. fázist nem befolyásolta (2. táblázat, 18A. ábra) a mekamilamin. Ezzel szemben az MLA nem befolyásolta egyik fázist sem. Magasabb koncentrációjú (300 μM) DMPP esetén sem a mekamilamin ($\text{DMPP}_{\text{kontroll}} = 100 \pm 8.69$, $n = 8$; $\text{DMPP}_{\text{mecam}} = 104.75 \pm 5.49$, $n = 4$), sem az MLA ($\text{DMPP}_{\text{kontroll}} = 100 \pm 9.99$, $n = 6$; $\text{DMPP}_{\text{MLA}} = 99.78 \pm 15.51$, $n = 6$) nem gátolta a [^3H]DA felszabadulást (18B. és 20. ábra).

Uptake gátló hatása a DMPP-kiváltotta [³H]DA felszabadulásra. A DA transzporter lehetséges szerepét a specifikus DA uptake gátló nomifensin segítségével vizsgáltuk.



18. ábra. Mekamilamin hatása a DMPP-kiváltotta [³H]DA felszabadulásra patkány striatum szeletekből. A DMPP-t a 0. időpillanattól adtuk és ezután végig jelen volt a perfúziós oldatban, a mekamilamint (10 μM) 6 perccel korábban kezdtük adni. A: alacsony koncentrációjú DMPP (30 μM) hatása. B: magas koncentrációjú DMPP (300 μM) hatása. Minden pont 4-12 kísérlet átlagát és standard hibáját képviseli.

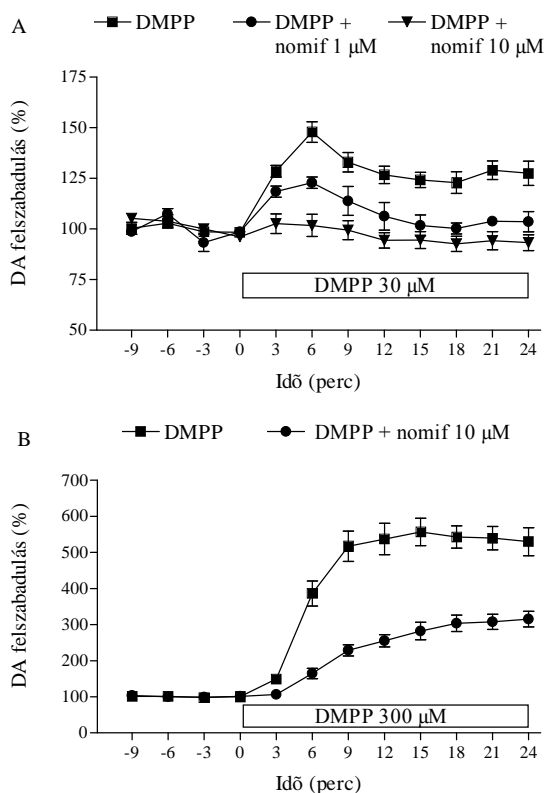
felszabadulásra. A vezikuláris exocitózis és a transzporter közvetítte felszabadulás elkülönítése céljából végeztük e vizsgálatokat. Az alacsony koncentrációjú DMPP válasz esetén az 1. fázist szignifikánsan gátolta mind a TTX (1 μM), mind a Ca²⁺-mentes közeg (73 illetve 83 %-os gátlás), míg a 2. fázist nem érintették ezek a kezelések (2. táblázat). A nagy koncentrációjú DMPP választ nem befolyásolta egyik kezelés sem (DMPP_{kontroll} = 100 ± 21.27, n = 4, DMPP_{TTX} = 115.57 ± 24.88, n = 4; DMPP_{kontroll} = 100 ± 15.66, n = 8; DMPP_{Ca²⁺-mentes} = 130.45 ± 18.79, n = 8) (20. ábra). Megjegyzendő, hogy mind a 30 mind a 300 μM-os DMPP válasz esetén megfigyelhető volt egy potencírozási tendencia (30 illetve 34 %-os emelkedés), de e hatások nem voltak szignifikánsak.

Önmagában a nomifensin (10 μM) nem befolyásolta a nyugalmi felszabadulást (nincs ábrázolva), de dózis-függő módon gátolta az alacsony koncentrációjú DMPP által kiváltott választ (19A. ábra). A gátló hatás erősebben jelentkezett a 2. fázisnál, melyet teljesen gátolt a nomifensin, de részleges gátlás megfigyelhető volt az első fázis esetében is (2. táblázat). A nagy koncentrációjú DMPP által kiváltott választ szintén szignifikánsan gátolta a nomifensin, habár nem teljes mértékben (19B. ábra). A csökkenés csak 60 % körüli volt (DMPP_{kontroll} = 100 ± 8.69, n = 8; DMPP_{nomif} = 39.34 ± 4.56, n = 4, p < 0.001, mivel minden kezelési csoportnak megvolt a saját kontrollja, kétirányú t-próbát használtunk a DA és 5-HT felszabadulást vizsgáló kísérletekben).

TTX és Ca²⁺-mentes közeg hatása a DMPP-kiváltotta [³H]DA

5.2.4. A DMPP nyugalmi 5-HT felszabadulásra kifejtett hatásának jellemzése

DMPP hatása a hippocampus szeletekből mért nyugalmi [³H]5-HT felszabadulásra. A 45 perces [³H]5-HT-nal történő inkubálás, majd 60 perces preperfúzió után a szeletek radioaktivitás tartalma 55757 ± 3882 Bq/g ($n = 25$) volt. A DMPP a 5-HT felszabadulást is dózis-függő módon fokozta, de a striatális DA felszabadulással ellentétben a hatás 50 μ M-os koncentrációnál elérte a maximumát (21. ábra), így meg tudtuk határozni az EC_{50} értéket, melyet 6.58 μ M-nak találtunk. A továbbiakban az ehhez közeli 10 μ M-os



19. ábra. Nomifensin hatása a DMPP-kiváltotta [³H]DA felszabadulásra patkány striatum szeletekből. A DMPP-t a 0. időpillanattól adtuk és ezután végig jelen volt a perfúziós oldatban, a nomifensin (1 vagy 10 μ M) a preperfúziós periódustól kezdve jelen volt. A: alacsony koncentrációjú DMPP (30 μ M) hatása. B: magas koncentrációjú DMPP (300 μ M) hatása. Minden pont 4-12 kísérlet átlagát és standard hibáját képviseli.

(10 μ M) által kiváltott választ. Az uptake gátló 1 μ M-ban 48 %-os gátlást okozott ($DMPP_{kontroll} = 100 \pm 8.96$, $n = 10$; $DMPP_{fluox1} = 51.63 \pm 6.54$, $n = 5$, $p < 0.01$), 10 μ M-ban pedig szinte teljes, 96 %-os gátlást ($DMPP_{kontroll} = 100 \pm 8.96$, $n = 10$; $DMPP_{fluox10} = 4.15 \pm 9.85$, $n = 10$, $p < 0.001$) (23. ábra).

DMPP koncentrációt használtuk. A válasz időlefutása a nagy koncentrációjú DMPP által kiváltott DA felszabadulásra emlékeztetett, mivel egyfázisú volt és néhány percen belül elérte a maximumát.

Nikotin antagonisták hatása a DMPP-kiváltotta [³H]5-HT felszabadulásra. A hippocampusban a DMPP-kiváltotta [³H]5-HT felszabadulást sem a mekamilamin (10 μ M) ($DMPP_{kontroll} = 100 \pm 13.87$, $n = 13$; $DMPP_{mekam} = 93.93 \pm 15.82$, $n = 11$) sem az MLA (10 nM) ($DMPP_{kontroll} = 100 \pm 25.80$, $n = 4$; $DMPP_{MLA} = 102.43 \pm 13.95$, $n = 5$) nem befolyásolta (22. és 24. ábra).

Uptake gátló hatása a DMPP-kiváltotta [³H]5-HT felszabadulásra. Az SSRI fluoxetin önmagában nem befolyásolta a hippocampális [³H]5-HT felszabadulást (nincs ábrázolva) azonban dózis-függő módon gátolta a DMPP

TTX és Ca^{2+} -mentes közeg hatása a DMPP-kiváltotta $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ felszabadulásra.

A DMPP-kiváltotta $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ felszabadulást nem befolyásolta sem a TTX ($1\ \mu\text{M}$) ($\text{DMPP}_{\text{kontroll}} = 100 \pm 9.68$, $n = 6$; $\text{DMPP}_{\text{TTX}} = 104.10 \pm 11.49$, $n = 5$) sem a Ca^{2+} -mentes közeg ($\text{DMPP}_{\text{kontroll}} = 100 \pm 9.74$, $n = 4$; $\text{DMPP}_{\text{Ca}^{2+}\text{-mentes}} = 96.15 \pm 25.18$, $n = 3$) (24. ábra).

5.2.5. DMPP hatása a $[^3\text{H}]DA$ és $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ felvételre patkány agyi szinaptoszóma preparátumban

Patkány striatumból készített szinaptoszóma preparátumban a DMPP dózis-függő módon gátolta a nagy affinitású $[^3\text{H}]DA$ ($50\ \text{nM}$) felvételt $3.18\ \mu\text{M}$ -os IC_{50} értékkel. Hasonlóan, patkány hippocampusból készített szinaptoszóma preparátumban a DMPP dózis-függő módon gátolta a nagy affinitású $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ ($50\ \text{nM}$) felvételt, habár hatékonyabban, mint a DA-t, hiszen az IC_{50} érték ($0.49\ \mu\text{M}$) egy nagyságrenddel kisebb volt (25. ábra).

2. táblázat. Az alacsony koncentrációjú DMPP ($30\ \mu\text{M}$) által kiváltott $[^3\text{H}]DA$ felszabadulás karakterizálása patkány striatum szeletekből. A két fázis, illetve a teljes válasz görbe alatti területét a 4.8.1. fejezetben ismertetettek szerint számoltuk ki. Minden kezelési csoportnak volt a saját kontroll csoportja, így a hatásokat a kontroll csoportban megfigyelhető válasz százalékában fejeztük ki. Minden adat 6-14 kísérlet átlagát és standard hibáját képviseli, az eredményeket kétutas t-próbával elemeztük (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). # Minden kontroll csoportnak más-más volt a standard hibája, ezért a táblázatban nem közöljük (ld. szöveg).

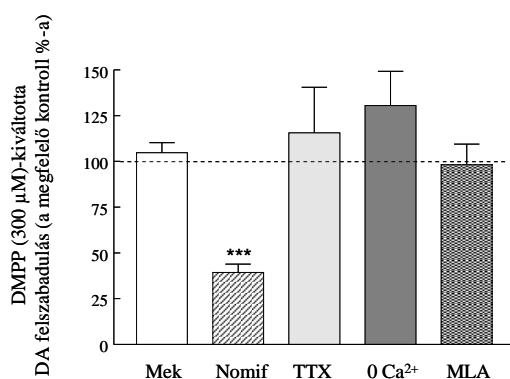
Kezelés	Teljes válasz (%)	1. fázis (%)	2. fázis (%)
DMPP ($30\ \mu\text{M}$)	100 [#]	100 [#]	100 [#]
+ mekamilamin ($10\ \mu\text{M}$)	74.11 ± 24.61	$3.38 \pm 22.11^{***}$	110.18 ± 26.85
+ MLA ($10\ \text{nM}$)	117.3 ± 12.72	92.5 ± 23.88	120.74 ± 12.25
+ nomifensin ($1\ \mu\text{M}$)	$38.97 \pm 4.67^{***}$	73.51 ± 9.62	$21.24 \pm 9.7^{**}$
+ nomifensin ($10\ \mu\text{M}$)	$6.31 \pm 5.87^{***}$	$18.69 \pm 11.17^{***}$	$0.04 \pm 4.51^{***}$
+ TTX ($1\ \mu\text{M}$)	76.70 ± 11.34	$22.88 \pm 3.53^{***}$	97.54 ± 2.48
+ Ca^{2+} -mentes közeg	113.18 ± 36.54	$16.15 \pm 12.71^{***}$	133.67 ± 45.13

5.2.6. Az eredmények értelmezése: a DMPP carrier megfordító hatása

DMPP-kiváltotta NA felszabadulás. Első kísérletsorozatunkban a DMPP-kiváltotta $[^3\text{H}]NA$ felszabadulásban szerepet játszó mechanizmusokat kívántuk vizsgálni. Ahogy azt már az elektromos ingerléses kísérletekből is sejteni lehetett, a DMPP-re adott válasz összetettnek bizonyult és tartalmazott egy olyan komponenst, amit nem lehetett gátolni nikotin antagonistával. A nyugalmi $[^3\text{H}]NA$ felszabadulás esetén a DMPP hozzáadása után

egy hirtelen kiugrást figyelhettünk meg (csúcs válasz), majd a felszabadulás visszaesett és stabilizálódott egy alacsonyabb szinten (farki válasz), mely azonban még mindig magasabb volt, mint a spontán NA felszabadulás. A mekamilaminnal, pancuroniummal és pipecuroniummal végzett kísérleteink egyértelműen bizonyították, hogy a válasz két komponensre bontható (26. ábra felső része), hiszen a csúcsválasz (1. fázis) teljesen eltűnt a nikotin antagonisták jelenlétében. Ezzel szemben a farki válasz (2. fázis) érintetlen maradt. Ebből arra következtethetünk, hogy az 1. fázis nikotin receptor közvetítette folyamat, míg a 2. fázis független e receptoroktól.

A transzmitter felszabadulási mechanizmusoknak két fő típusát ismerjük. Az egyik a klasszikus, exocitózissal lezajló vezikuláris felszabadulás, a másik az uptake rendszereken



20. ábra. Magas koncentrációjú DMPP (300 µM) által kiváltott striatális [³H]DA felszabadulás karakterizálása. Minden csoportnak volt egy saját párhuzamos kontroll csoportja, és a hatásokat ehhez viszonyítva fejeztük ki (a pontozott vonal a 100 %-os értéket képviseli, a szórásokat ld. az eredmények szekcióban. Mindegyik oszlop 4-7 kísérlet átlagát és standard hibáját képviseli. Az adatokat kétutas t-próbával elemeztük (***) p < 0,001). Rövidítések: Mek = mekamilamin 10 µM; Nomif = nomifensin 10 µM; TTX = tetrodotoxin 1 µM; 0 Ca²⁺ = Ca²⁺-mentes oldat 1 mM EGTA-val; MLA = methyllycaconitine 10 nM.

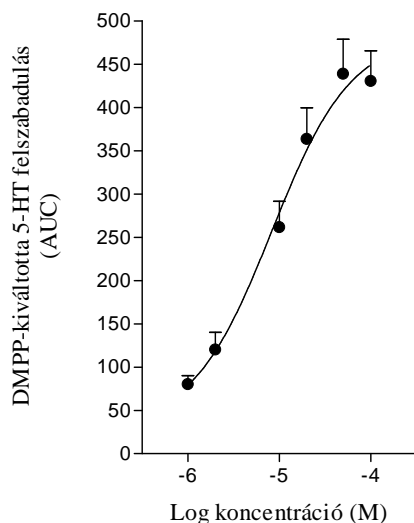
preszinaptikus α₂-adrenoceptorok által modulált folyamat (Kiss és mtsai, 1995). Kísérleteink azt mutatták, hogy az 1. fázis Ca²⁺-mentes közegben, illetve az aspecifikus Ca²⁺-antagonista Cd²⁺ jelenlétében eltűnt. A transzmitter tartalmú vezikulumok exocitózisa általában akciós potenciál tovaterjedéséhez kötött. Az akciós potenciálokat felfüggesztő TTX szintén gátolta az 1. fázist. Végezetül az α₂-adrenoceptorokra ható xylazinnal és CH-38083-mal folytatott kísérletek igazolták, hogy az 1. fázis preszinaptikusan modulálható. Ezek az adatok a nikotin antagonistákkal folytatott kísérletek eredményeivel együtt azt bizonyítják, hogy az 1. fázis

keresztül történő carrier közvetítette felszabadulás. Az exocitózis Ca²⁺- és TTX függő, preszinaptikusan modulálható, de nem érzékeny uptake gátlókra, míg a carrier-mediálta felszabadulás az előző mechanizmusnak szinte tükörképeként Ca²⁺- és TTX független, preszinaptikusan nem modulálható, de érzékeny az uptake gátlókra (Levi és Raiteri, 1993). Mindezek ismeretében a további kísérletekkel a két fázis karakterizálása volt a célunk.

Az 1. fázis jellemzése. Általánosan elfogadott, hogy a NA vezikuláris felszabadulása [Ca²⁺]_o-függő és

egy nikotin receptorok közvetítésével kialakuló exocitotikus felszabadulási folyamatnak felel meg.

A 2. fázis jellemzése. A 2. fázis dinamikája nagyon különbözik az 1. fázisétól. Lassan fejlődik ki, és fennmarad mindaddig, amíg a szövet ki van téve a DMPP hatásának. A 2. fázis



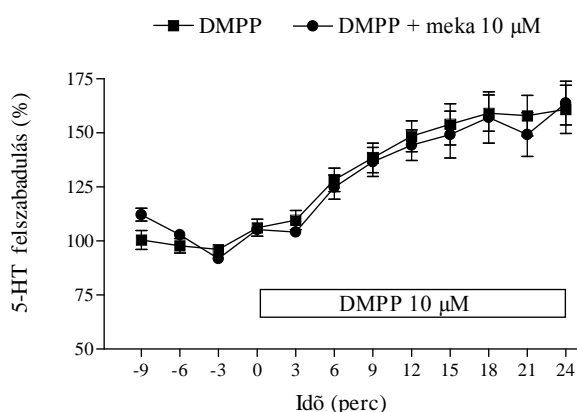
21. ábra. DMPP hatása a nyugalmi [^3H]5-HT felszabadulásra patkány hippocampus szeletekből. A választ a Módszerek fejezetben ismertetett görbe alatti terület számításával határoztuk meg. Minden pont 4-5 független kísérlet átlagát és standard hibáját képviseli. Az EC_{50} értéket nem-lineáris regresszióval határoztuk meg.

nem blokkolható nikotin antagonistákkal, Ca^{2+} -mentes közeggel, Cd^{2+} -mal illetve TTX-nal, emellett nem modulálható α_2 -adrenoceptorokra ható szerekkel. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a 2. fázis nem lehet exocitózis eredménye. Az uptake gátlókra való érzékenysége további bizonyítékot szolgáltat a carrier rendszerrel való kapcsolatára. Már korábban is megfigyelték, hogy a DMPP képes a NA uptake blokkolására a periférián (Holbach és mtsai, 1977). Megállapítást nyert, hogy a NA uptake rendszer minden szubsztrátja képes a carrier megfordítására (Langeloh és Trendelenburg, 1987). Kimutatták, hogy a DMPP képes NA felszabadítására a vas deferensből Ca^{2+} -mentes közegben, ha a vezikuláris uptake és a MAO gátolt, normál viszonyok mellett azonban ez a hatása

nagyon gyenge (Niebler és Trendelenburg, 1990). A mi eredményeink további bizonyítékokat szolgáltatnak arra, hogy a DMPP képes carrier-mediálta NA felszabadulás kiváltására. Alátámasztja ezt az a megfigyelésünk is, mely szerint a Ca^{2+} -mentes közeg fokozza a 2. fázist. Ez igen jellemző a carrier-mediálta felszabadulásra, ugyanis ilyenkor a neurotransmitter a citoplazmatikus poolból ürül, ez a pool pedig Ca^{2+} -mentes közegben a vezikuláris felszabadulás gátlása miatt növekszik, tehát több transzmitter lesz elérhető az uptake rendszer számára. Érdekes különbséget figyelhetünk meg a perifériás és a centrális idegrendszer között. Míg a DMPP a periférián csak akkor tud jelentős Ca^{2+} -független felszabadulást kiváltani, ha a vezikuláris uptake-et és a MAO-t gátoljuk, addig a központi idegrendszerben erre nincs szükség. Ez azt mutatja, hogy a periférián az aktív metabolizmus és vezikuláris transzport miatt a citoplazmatikus pool kisebb, mint a központi idegrendszerben. Mindezek alapján egyértelmű, hogy a DMPP által kiváltott NA felszabadulás 2. fázisa egy NA transporter által közvetített folyamat következménye.

Összefoglalva kísérletsorozatunk eredményeit, a DMPP két különböző mechanizmus segítségével képes a hippocampális NA felszabadulás fokozására: egyrészt a noradrenerg idegvégződéseken található nikotin receptorok közvetítésével vezikuláris exocitózist okoz, másrészt a NA uptake rendszer megfordítása révén carrier-mediálta NA felszabadulást képes kiváltani (26. ábra alsó része).

DMPP-kiváltotta DA és 5-HT felszabadulás. Mint ahogy azt a 2.2. fejezetben részletesen taglaltuk, a monoamin transzporterek ugyanahhoz a fehérje családkhoz tartoznak



22. ábra. Mekamilamin hatása a DMPP-kiváltotta [3 H]5-HT felszabadulásra patkány hippocampus szeletekből. A DMPP-t a 0. időpillanattól adtuk és ezután végig jelen volt a perfúziós oldatban, a mekamilamint (10 μ M) 6 perccel korábban kezdtük adni. Minden pont 10-12 kísérlet átlagát és standard hibáját képviseli.

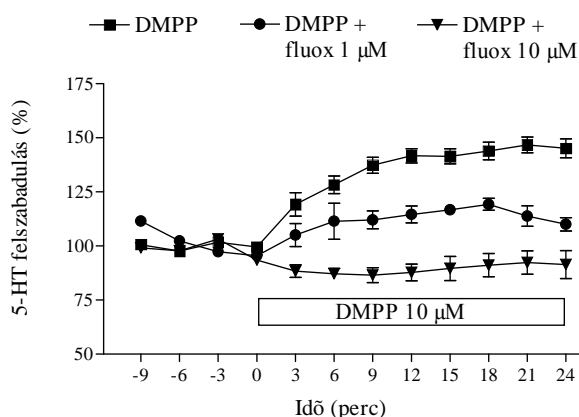
és aminosav sorrendjükben nagyfokú homológia fedezhető fel. Mindennek jelentős funkcionális következményei vannak, gondoljunk csak a heterológ uptake jelenségére. A következő vizsgálatsorozatban éppen ezért azt kívántuk tisztázni, hogy a DMPP képes-e a NET-en túl az egyéb monoamin transzporterek (DAT, SERT) működésének befolyásolására. Ezért a NA felszabaduláshoz teljesen hasonló körülmények között vizsgáltuk a DMPP hatását a DA és 5-HT felszabadulásra

is. Mint látni fogjuk, a NA-nál megfigyeltekhez hasonló jelenségek mellett jelentős eltéréseket is találtunk az egyes transzmittereknél, ugyanis a nAChR illetve a carrier-mediálta felszabadulás aránya és mértéke más és más volt a DA-nál és a 5-HT-nál.

A nAChR-ok szerepe a DMPP-kiváltotta monoamin felszabadulásban. A NA felszabadulást vizsgálva (Kiss és mtsai, 1997) azt találtuk, hogy a nAChR közvetítette válasz (1. fázis) dózis-függő módon emelkedett és 100 μ M-os DMPP koncentráció mellett érte el a maximumát. Ezzel szemben a nAChR-ok szerepét csak az alacsonyabb koncentrációjú DMPP által kiváltott DA felszabadulás esetén tudtuk igazolni, de sem a magas koncentrációval kiváltott DA, sem a 5-HT válasz nem volt érzékeny a nikotin antagonistákra.

A nAChR-ok szerepe a dopaminerg ingerület-átvitel szabályozásában sokszorosan igazolt. Az acetilkolin növelte a DA felszabadulást striatális szinaptoszóma preparátumból, és ez a hatás gátlható volt a nAChR antagonistá hexametóniummal (De Belleruche and Bradford, 1978). E korai megfigyelés óta számos további tanulmány igazolta a nAChR-ok jelenlétét a dopaminerg varikozitásokon (Rapier és mtsai, 1990; Grady és mtsai, 1992;

Soliakov és mtsai, 1995; Clarke és Reuben, 1996; Kulak és mtsai, 1997; Teng és mtsai, 1997; Puttfarcken és mtsai, 2000). Mi lehet az oka, hogy magasabb koncentrációjú DMPP esetén mégis teljes mértékben mekamilamin-inszenzitív volt a válasz? Az egyik lehetséges



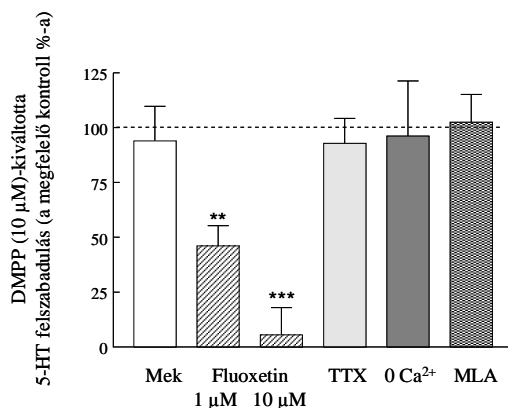
23. ábra. Fluoxetin hatása a DMPP-kiváltotta [3 H]5-HT felszabadulásra patkány hippocampus szeletekből. A DMPP-t a 0. időpillanattól adtuk és ezután végig jelen volt a perfúziós oldatban, a fluoxetin (1 vagy 10 μ M) a preperfúziós periódustól kezdve jelen volt. Minden pont 5-10 kísérlet átlagát és standard hibáját képviseli.

magyarázat a nAChR-ok deszenzitizációja. A szeletperfúziós berendezés sajátosságai miatt a drog adagolás nem elég gyors ahhoz, hogy deszenzitizáció nélküli választ váltson ki, ugyanis a kamrában több mint 30 másodperc alatt alakul ki a végső drog koncentráció. Ezalatt az időszak alatt a DMPP koncentráció olyan tartományban is mozog, mely még nem elégséges a receptor válasz kialakulására, de már kiválthat

deszenzitizációt. Érdekes módon a hippocampális NA felszabadulás mérése során nem figyeltünk meg hasonló jelenséget (Kiss és mtsai, 1997). Ez nagy valószínűséggel a nAChR-ok nagyfokú heterogenitásával magyarázható. A neuronális nAChR-ok 5 alegységből épülnek fel és vagy α (α 2- α 6) és β (β 2- β 4) alegységeket tartalmazó heterooligomer vagy α 7, α 8, illetve α 9 alegységet tartalmazó homooligomer formában fordulnak elő (Lindstrom és mtsai, 1996; Le Novere és mtsai, 2002). A felhalmozódó adatok azt mutatják, hogy a hippocampális NA és striatális DA felszabadulást szabályozó nAChR-ok különböző alegység összetételűek. A hippocampus a locus coeruleusból kapja a noradrenerg beidegzést, ahol α 3, β 2 és β 4 mRNS-t mutattak ki *in situ* hibridizációs technikával. Ezzel szemben a striatumot beidegző substantia nigrában az α 4, α 5, β 2 és β 3 alegységek mRNS expressziója volt megfigyelhető (Wada és mtsai, 1989). Az összehasonlító farmakológiai vizsgálatok megerősítették a különböző altípusú nAChR-ok jelenlétét (Sacaan és mtsai, 1995) és a hibridizációs eredményekben arra a következtetésre jutottak, hogy a hippocampusban α 3 β 2 (Sershen és mtsai, 1997) vagy α 3 β 4 (Clarke és Reuben, 1996; Luo és mtsai, 1998) összetételű, míg a striatumban nagy valószínűséggel α 4 β 2 (Marks és mtsai, 1994; Sharples és mtsai, 2000) összetételű nAChR-ok modulálják a monoamin felszabadulást. A nAChR-ok alegység összetétele meghatározza a receptorok deszenzitizációs tulajdonságait (Cohen és mtsai, 1995;

Fenster és mtsai, 1997; Corringer és mtsai, 1998; Quick és Lester, 2002), és a deszenzitizációs kinetika eltéréseit már ki is mutatták a hippocampusban és striatumban (Dani és mtsai, 2000), így az eltérő alegységösszetétel magyarázhatja az általunk megfigyelt eltéréseket.

A nAChR-ok szerepe a 5-HT felszabadulás szabályozásában egy kevésbé feltárt terület. Egyetlen kutatócsoport számolt be arról, hogy a nikotin fokozza a 5-HT felszabadulást

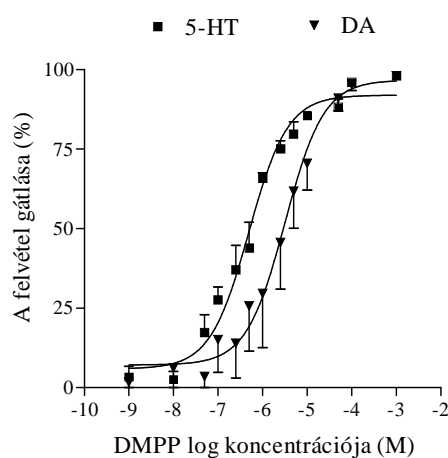


24. ábra. DMPP (10 μM) által kiváltott hippocampális [³H]5-HT felszabadulás karakterizálása. Minden csoportnak volt egy saját párhuzamos kontroll csoportja, és a hatásokat ehhez viszonyítva fejeztük ki (a pontozott vonal a 100 %-os értéket képviseli, a szórásokat ld. az eredmények szekcióban. Mindegyik oszlop 4-12 kísérlet átlagát és standard hibáját képviseli. Az adatokat kétutas t-próbával elemeztük (** p < 0,01; *** p < 0,001). Rövidítések: Mek = mekamilamin 10 μM; TTX = tetrodotoxin 1 μM; 0 Ca²⁺ = Ca²⁺-mentes oldat 1 mM EGTA-val; MLA = methyllycaconitine 10 nM.

gátolható mekamilaminnal és Ca²⁺-inszenzitívnek bizonyult. Későbbi eredményeink bizonyították, hogy a DMPP a NET funkcióját befolyásolja (Kiss és mtsai, 1997; Santha és mtsai, 2000). Kimutatták, hogy a nikotin fokozni tudja a 5-HT felszabadulást striatális szinaptoszómából, de nem képes ugyanerre hippocampalis szinaptoszóma készítmény esetén (Reuben és Clarke, 2000). Egy másik tanulmány szerint a nikotin agonisták vezikuláris exocitózissal történő NA és DA felszabadulást váltottak ki prefrontális kéreg szeletekből, ugyanakkor nem tudták fokozni a 5-HT felszabadulást (Rao és mtsai, 2003). Saját adataink megerősítik a fenti tanulmányok következtetéseit, és azt sugallják, hogy a nAChR-ok nagy valószínűséggel nem játszanak szerepet a hippocampális 5-HT felszabadulás szabályozásában, habár egy speciális alegység összetételű és deszenzitizációs kinetikájú receptor jelenléte nem zárható ki teljes biztonsággal.

patkány hippocampus szeletekből (Kenny és mtsai, 2000), azonban ez a hatás csak részben volt gátolható a nAChR antagonist mekamilaminnal, és nem volt érzékeny TTX-re vagy a Ca²⁺-mentes közegre, tehát jellemzői alapján nem egy nAChR közvetítette exocitózis volt. Más tanulmányok sem tudták igazolni a nAChR-ok szerepét. Csoportunk korábbi munkájában (Lendvai és mtsai, 1996) azt találtuk, hogy hagyományos nikotin agonistákkal (nikotin, citizin, epibatidin) nem lehetett 5-HT felszabadulást kiváltani hippocampus szeletekből, de a DMPP hatására megnőtt a 5-HT felszabadulás, habár ez a válasz nem volt

A monoamin transzporterek szerepe a DMPP-kiváltotta monoamin felszabadulásban. Mint a NA esetében tapasztaltuk, a DMPP képes volt a NET működési irányának megfordítására. Eredményeink azt mutatják, hogy ez a hatás az összes monoamin



25. ábra. DMPP hatása a [³H]DA és [³H]5-HT felvételre patkány striatális, illetve hippocampális szinaptoszóma preparátumban. Minden pont 3 független kísérlet átlagát és standard hibáját képviseli. Az IC₅₀ értéket nem-lineáris regresszióval számítottuk ki.

transzporter esetében érvényesül, hiszen mind a DA, mind a 5-HT felszabadulás érzékeny volt a megfelelő szelektív monoamin uptake gátlókra. Mindazonáltal, jelentős eltérések voltak a két rendszer válaszában, hiszen a DA felszabadulás nem érte el a maximumát az igen széles DMPP koncentráció tartományban (1 μ M – 10 mM), míg a 5-HT felszabadulás már egy aránylag alacsony koncentrációnál (50 μ M) elérte a maximumot.

Ebben a tekintetben a 5-HT felszabadulás a NA felszabadulásra hasonlított, ahol a maximális hatás 100 μ M-nál jelentkezett (Kiss és mtsai, 1997).

Ezek az eredmények valószínűleg a különböző monoaminerg rendszerek anatómiai sajátágaival magyarázhatók. A hippocampus 5-HT varikozitás sűrűsége (2.7 millió/mm³) nagyon hasonló a NA-éhoz (Oleskevich és Descarries, 1990), míg a striatum DA varikozitás sűrűsége két nagyságrenddel nagyobb, kb. 150 millió/mm³ (Doucet és mtsai, 1986), ami magyarázhatja a válasz nagyságában tapasztalható különbségeket. Adataink szerint a nagy koncentrációjú DMPP alkalmazásakor a DAT gátló nomifensin (10 μ M) csak részlegesen tudta gátolni a választ. Ennél a szupramaximális koncentrációnál a nomifensin már teljesen gátolja a DA transzportert, hiszen az IC₅₀ értéke a nM-os tartományban mozog (Fielding és Szewczak, 1984). Ezért mérlegelnünk kell egy további komponenst a DA felszabadulásban, ami nem a DAT-on keresztül zajlik és nem is a nAChR-ok közvetítésével, hiszen mekamilaminnal sem gátolható. Feltehetően ezt a komponenst valamilyen aspecifikus hatás okozza, ami a magas DMPP koncentráció következménye lehet, a mechanizmus felderítése azonban meghaladja jelen munkánk kereteit.

Eredményeink megmagyarázhatják azt a korábban már említett megfigyelést, miszerint a konvencionális nikotin agonisták nem képesek 5-HT felszabadulás kiváltására patkány prefrontális kéreg szeletekből, a DMPP viszont robusztus növekedést okoz, azonban ez a válasz nem gátolható nikotin antagonistákkal és nem érzékeny TTX-re vagy Ca²⁺-mentes közegre (Rao és mtsai, 2003). A leírt tulajdonságok az általunk is javasolt carrier-mediálta

transzmitter felszabadulásra jellemzőek. A hatás mechanizmusa a szinaptoszómális DA és 5-HT felvételi kísérleti eredményeink szerint a NA transzporternél leírtakhoz hasonló (Niebler és Trendelenburg, 1990), vagyis a DMPP szubsztrátja a DAT-nak és a SERT-nek is, és kicserélődési mechanizmussal váltja ki a transzmitter felszabadulást.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a DMPP képes kölcsönhatásba lépni a monoamin transzporterekkel és így jelentős mértékű carrier-mediálta NA, DA és 5-HT felszabadulást eredményezhet, ezért különös óvatosságra van szükség az olyan vizsgálatok eredményeinek értékelésénél, ahol a DMPP-t mint nikotin agonista vegyületet használják.

5.2.7. A carrier-mediálta transzmitter felszabadulás jelentősége: az aktív antidepresszánsok elmélete

A depresszió mint nem-szinaptikus betegség. A depresszió leginkább elfogadottnak tekintett elmélete, a monoamin teória szerint a betegség kialakulásának legfontosabb neurokémiai oka a monoaminerg ingerület-átvitel elégtelenné válása, és ennek következtében a NA és/vagy 5-HT extracelluláris koncentrációjának csökkenése (Schildkraut, 1965; Doris és mtsai, 1999). Habár az elmúlt 30 évben számos alternatív hipotézis is kidolgozásra került a depresszió etiológiájával kapcsolatban (Hindmarch, 2001; Wong és Licinio, 2004), a jelenleg használatban lévő antidepresszánsok döntő többsége a monoaminerg ingerület-átvitel serkentésével fejti ki hatását.

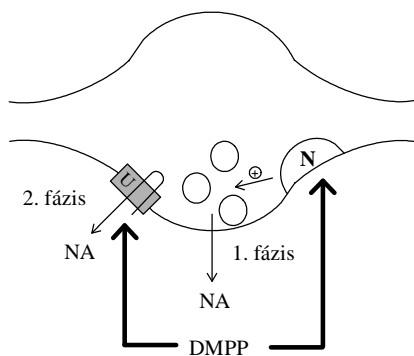
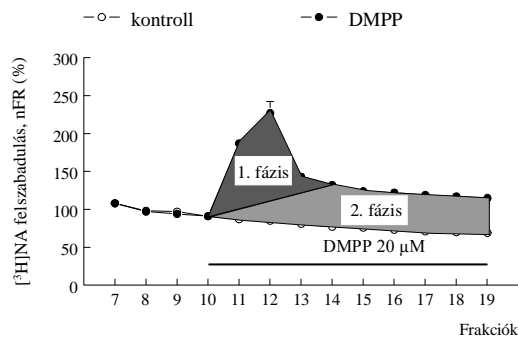
Mint már említettük, a monoaminerg rendszerek közös sajátossága, hogy a sejttestek kis kéreg alatti magvakban helyezkednek el, míg dúsan elágazó, varikózus axonjaik nagy agyterületeket idegeznek be. Kimutatták, hogy a monoaminerg varikozitások több mint 80 %-a nem képez szinaptikus kapcsolatot (Umbriaco és mtsai, 1995), habár rendelkezik a transzmitter felszabaduláshoz szükséges minden fehérjével és kimutathatóan ki is bocsát transzmittereket az extracelluláris térbe. A fent említett neuroanatómiai sajátságok miatt a depresszióban leginkább szerepet játszó transzmitter rendszerek elsősorban nem-szinaptikus kapcsolatokban vesznek részt. Mindezek alapján logikusnak tűnik az a feltételezés, hogy a depresszió a nem-szinaptikus kommunikáció zavara miatt lép fel, tehát a problémát elsősorban a monoaminok extraszinaptikus koncentrációjának csökkenése váltja ki, azaz a depressziót valóban tekinthetjük egyfajta nem-szinaptikus betegségnak. Ha elfogadjuk ezt a megközelítést, világos, hogy a depresszió kezelésében olyan stratégiákat kell követni, melyek a nem-szinaptikus ingerület-átvitel javítására koncentrálnak (Vizi, 2000).

A jelenleg használt antidepresszánsok kritikai áttekintése. A jelenleg használt antidepresszánsok fő hatása az extracelluláris monoamin szint különböző mechanizmusokkal

történő emelése (Millan, 2006). A triciklikus antidepresszánsok, az SSRI vegyületek, a szelektív NA reuptake inhibitorok (SNRI) és az atípusos antidepresszánsok jelentős része a monoaminok visszavételét gátolják. Bizonyos atípusos antidepresszánsok (pl. mianserin) a monoaminerg terminálisokon elhelyezkedő preszinaptikus autoreceptorokat gátolják, így kikapcsolják az e receptorok által közvetített negatív visszacsatolást és emiatt több transzmitter szabadul fel az akciós potenciál hatására. A MAO inhibitorok gátolják a transzmitterek lebomlását a citoplazmában, így a vezikulákba több monoamin kerülhet. A különböző hatásmechanizmusok ellenére a klinikai megfigyelések szerint a betegek 30-40 %-a rezisztens az antidepresszáns kezelésre, és az eredményes kezelések esetén is csak 3-4 héttel a terápia megkezdése után mutatkozik javulás (Wong és Licinio, 2004; Malberg és Blendy, 2005). Ha elfogadjuk azt a feltételezést, hogy a depressziós betegekben a monoaminok extraszinaptikus koncentrációja tartósan alacsonyabb mint az egészségesekben, arra kell következtetnünk, hogy a jelenleg használt szerek nem elég hatékonyak a monoamin szint normalizálásában. De mi lehet az oka ennek a hatástalanságnak?

Elképzelésünk szerint egy lehetséges magyarázat, hogy a jelenleg használt szerek hatásmechanizmusa passzív. A visszavétel-gátlók megakadályozzák a felszabadult transzmitter felvételét, a negatív visszacsatolást felfüggesztő szerek fokozzák az akciós potenciál hatására felszabaduló transzmitter mennyiségét, míg a MAO inhibitorok indirekt úton növelhetik a vezikulák transzmitter tartalmát és ezen keresztül az ürülő monoaminok mennyiségét. Ezen anyagok közös jellemzője, hogy csak akkor tudják hatásosan növelni az extracelluláris monoamin szintet, ha a monoaminerg idegsejtek elektromosan aktívak és transzmittereket bocsátanak ki magukból, akciós potenciál-kiváltotta vezikuláris exocitózis nélkül azonban hatástalanok. A depresszióban tapasztalható monoaminerg diszfunkció oka ugyan nem ismert, de valószínűsíthető, hogy egy fontos tényező lehet a monoaminerg sejtek elektromos aktivitásának csökkenése, hiszen az extracelluláris monoamin szint legfontosabb meghatározó tényezője az aktivitás-függő transzmitter felszabadulás. Ilyen hipofunkció esetében azonban a jelenleg használt antidepresszánsok kevésbé hatékonyak, hiszen nem képesek kifejteni serkentő hatásukat, ha inaktívak az idegsejtek és nincs megfelelő transzmitter kiáramlás. Ha a monoaminerg rendszer hipofunkciója súlyosabb fokú, a betegek értelemszerűen rezisztensek lesznek az antidepresszáns kezelésre. Összegezve, a jelenleg használt antidepresszánsok passzív hatásmechanizmusuk miatt képtelenek a megfelelő mértékű monoamin szint emelkedés elérésére, ami megmagyarázhatja a hatás lassú kialakulását és a terápia-rezisztens betegek magas arányát.

Az aktív antidepresszánsok elmélete. A szinaptikus transzmisszió csak akkor képes specifikus információátvitelre, ha a transzmitter csak rövid ideig tartózkodik a receptorok



26. ábra. A DMPP $[^3\text{H}]\text{NA}$ felszabadulásra kifejtett hatásának összetevői. Fent: A válasz két komponense. Lent: A két komponens mechanizmusának magyarázata. Az 1. fázis egy nikotin receptor (N) által közvetített excitáció, míg a 2. fázis a transzporter (U) megfordulása következtében kialakuló carrier-mediálta transzmitter felszabadulás.

közelében. A monoaminok esetén az inaktiváció első és legfontosabb lépése a neuronális visszavétel. Mivel a monoamin transzporterek a Na^+ -ion elektrokémiai gradiensét használják működésükhöz, bizonyos körülmények között (mikor az intracelluláris Na^+ -koncentráció megemelkedik) a gradiens változása megfordíthatja a működés irányát és belülről kifelé irányuló transzportot eredményezhet (Levi és Raiteri, 1993). Ez a carrier-mediálta transzmitter felszabadulás olyan anyagok jelenlétében is megfigyelhető, melyek a transzporter szubsztrátjai. Ezek az anyagok egy csere-mechanizmust indítanak be, melynek során a transzporter felveszi őket a sejtbe, és kifelé transzmittereket szállít (Trendelenburg, 1991).

Kétirányú működésük következtében a monoamin transzporterek kiemelkedően fontos szerepet játszanak az

ingerület-átviteli folyamatok szabályozásában. Egyrészt biztosítják a szinaptikus ingerület-átvitel specificitását a transzmitter receptorok környékéről való eltávolításával (visszavételi funkció), másrészt a ki- és befelé irányuló transzport közötti egyensúlyozással beállítanak és fenntartanak egy viszonylag állandó és meglehetősen alacsony transzmitter szintet az extraszinaptikus térben, ami elengedhetetlen az idegi hálózatok optimális működéséhez (regulatórikus funkció) és elsősorban a nem-szinaptikus kölcsönhatásokat érinti (Vizi, 1984; Vizi és Lábos, 1991).

A klinikumban alkalmazott uptake gátló típusú szerek ezidáig csak a visszavételi funkciót vették célba, azonban a DMPP-vel folytatott kísérlet-sorozatunk arra hívja fel a figyelmet, hogy a monoamin transzporterek regulatórikus funkciója szintén célpontja lehet

bizonyos szereknek, mivel a monoaminok carrier-mediálta felszabadulása új terápiás stratégia lehet a depresszió kezelésében. Mint azt a korábbiakban tárgyaltuk, a jelenleg használt antidepresszánsok csak akkor képesek a monoaminerg ingerület-átvitel serkentésére, ha akciós potenciál-kiváltotta vezikuláris exocitózis történik. Ilyenformán e szerek hatásmechanizmusa passzív, mert hatékonyságuk függ az idegsejtek elektromos aktivitásától. A monoamin transzporterek fordított működése azonban elméleti alapját képezheti egy új típusú vegyületcsalád kifejlesztésének. Habár a DMPP farmakológiai tulajdonságai miatt nyilvánvalóan alkalmatlan kiindulási vegyület, hatásmechanizmusa ideális mivel 1.) a monoaminok carrier mediálta felszabadulása állandó és folyamatos emelkedését biztosítja az extracelluláris (elsősorban extraszinaptikus) monoamin szinteknek, még akkor is ha az idegsejtek nem mutatnak tüzelési aktivitást (ezen tulajdonságuk miatt nevezhetjük ezeket a szereket aktív antidepresszánsoknak, mivel működésük nem függ a monoaminerg sejtek elektromos aktivitásától); 2.) a transzporterek megfordult működése akadályozza a transzmitterek visszavételét, így ezek az új típusú antidepresszánsok rendelkeznek a jelenleg használt szerek jótékony felvétel gátló hatásával is. Mivel ezek a hatások elsődlegesen a nem-szinaptikus kölcsönhatásokat javítanák az extracelluláris tér monoaminokkal történő folyamatos feltöltésével, az aktív antidepresszánsok nagy valószínűséggel hatékonyak lehetnének a terápia-rezisztens betegekben is és várhatóan rövidebb idő alatt alakulna ki terápiás hatásuk is.

Természetesen az ideális aktív antidepresszánssal szemben van néhány követelmény, melyek teljesítése nélkül nem kaphatunk klinikailag használható szert. Az egyik fontos feltétel a szelektivitás. Mint arról már szóltunk, a monoamin transzporterek között nagyfokú aminosav szekvencia azonosság áll fenn, ami funkcionális következményekkel jár (ld. heterológ uptake, 5.4. fejezet). A depresszió patofiziológiai történései elsősorban a noradrenerg és szerotonerg rendszere korlátozódnak, a dopaminerg rendszer kevésbé érintett. Ez utóbbi rendszer elsődlegesen az agyi jutalmazási mechanizmusokban játszik szerepet (Maldonado, 2003; Salamone és mtsai, 2005), ezért az ideális aktív antidepresszánsnak csak a NET-re és a SERT-re kellene hatnia, a DAT-ra nem, máskülönben egy magas addikciós potenciállal rendelkező szerhez jutnánk. Tekintettel a jelenleg is elérhető nagyszámú szelektíven NET és/vagy SERT-re ható SNRI és SSRI vegyületekre, lehetségesnek tűnik olyan anyagok kifejlesztése, melyek csak a NA és/vagy 5-HT carrier-mediálta felszabadulását váltják ki, de nem hatnak a dopaminerg rendszerre. A másik fontos követelmény a megfelelő erősségű válasz. Az aktív antidepresszánsok által kiváltott hatásnak moderáltnak kell lennie, mivel a NA és/vagy 5-HT szint robusztus emelkedése káros

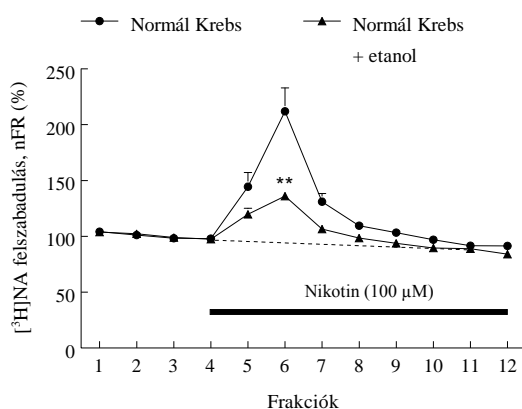
mellékhatások kialakulásához vezethet. Jó példa erre az amfetamin származék MDMA (ecstasy) hatása, mely jelentős DA, NA és 5-HT felszabadulást okoz (White és mtsai, 1996; Gnegy, 2003; Sulzer és mtsai, 2005). Az ezzel összefüggő központi idegrendszeri hatások között megtaláljuk az eufóriát, a hallucinációt, a kognitív funkciók zavarát, és számos egyéb káros mellékhatást, mint az izgatottság, zavart és bizarr viselkedés, és akár pszichózis is (Morland, 2000). Állatkísérletekben az MDMA több mint 1000 %-os növekedést okozott a monoamin felszabadulásban agyszeletekből (Knoll és Vizi, 1971; Vizi és mtsai, 2004b). Hasonló kísérleti körülmények között a DMPP hatása sokkal gyengébb volt, még 1 mM-os koncentrációban sem haladta meg a 60 %-os emelkedést. Nyilvánvaló, hogy az ideális aktív antidepresszánsnak a DMPP-hez hasonló nagyságrendű hatással kell rendelkeznie, hogy a nem-kívánt reakciókat elkerülhessük. Ha a gyógyszerfejlesztésnek sikerül kikerülnie ezeket a csapdákat, a transzporter működési irányának megfordításával ható aktív antidepresszánsok jelentősen javíthatják az antidepresszáns kezelés hatékonyságát.

5.3. Antidepresszánsok nem-konvencionális hatásai a központi idegrendszerben: a depresszió neurokémiai hátterének vizsgálata

Mint láthattuk, a DMPP speciális tulajdonságokkal bíró vegyület, hiszen a többi klasszikus nikotin agonistától eltérően nemcsak a nAChR stimulálása révén képes a monoamin felszabadulás serkentésére, hanem a monoamin transzporter működési irányának megfordításával is. A DMPP hatásának elemzése során a transzporterek érintettségének bizonyítása érdekében monoamin uptake gátló szereket használtunk és e kísérletek során bukkantunk arra az érdekes és váratlan felismerésre, hogy az uptake gátlók nemcsak a carrier-mediálta komponenst gátolják, hanem a nAChR közvetítette választ is (Kiss és mtsai, 1997). A következő hosszabb kísérletsorozatban ezt a jelenséget kívántuk részletesebben elemezni. Mivel a DMPP komplex hatásokkal rendelkezik, ami bonyolíthatja az adatok értelmezését, a továbbiakban a nikotin-kiváltotta transzmitter felszabadulást használtuk, és ezen technika segítségével kívántuk egyrészt kvantitatívan jellemezni az uptake gátlók nAChR antagonistá erősségét, másrészt elemezni az uptake gátlók hatásmechanizmusát.

5.3.1. Monoamin uptake gátló típusú antidepresszánsok hatása a központi idegrendszer nAChR-aira

Nikotin hatása a nyugalmi [³H]NA felszabadulásra patkány hippocampus

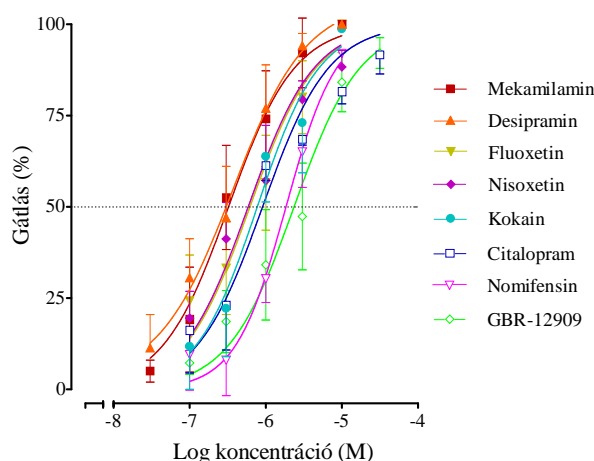


27. ábra. Nikotin hatása a nyugalmi [³H]NA felszabadulásra patkány hippocampus szeletekből. Az etanolt a citalopram oldásához használtuk, ezért a megfelelő kontrollban a Krebs oldat ekvimoláris etanolt (3 mg/ml) tartalmazott. A nikotint (100 µM) a 4. frakciótól adtuk folyamatosan. A válasz görbe alatti területét az elméleti alapvonalhoz (pontosított vonal) képesti emelkedésként számoltuk ki. A területek összehasonlítását kétutas Welch t-próbával végeztük (** p<0.01).

szeletekből. A 45 perces [³H]NA-nal történő inkubálás, majd 60 perces preperfúzió után a szeletek radioaktivitás tartalma 3635812 ± 140233 Bq/g (n=110) volt. Nikotin (100 µM) folyamatos perfúziója a negyedik frakciótól kezdődően jelentősen megemelte a [³H]NA nyugalmi felszabadulását (a bazálishoz képesti emelkedést a görbe alatti terület módszerével kiszámolva $AUC_{4-10} = 323.18 \pm 44.24$ % értéket kaptunk, n=28). A válasz átmenetinek bizonyult, mivel a nikotin folyamatos jelenléte ellenére 4 frakción (12 percen)

belül visszatért az alapszintre (27. ábra). Habár a válasz időlefutása nem változott, nagysága szignifikánsan kisebb lett ($AUC_{4-10} = 87.19 \pm 6.02 \%$, $n=8$, $p < 0.01$ kétutas Welch-féle t próba), mikor a Krebs oldatban a citalopram oldószereként használt etanol (3 mg/l) is jelen volt a citalopramos kezelés kontroll csoportjában (27. ábra). Az etanol gátló hatását nem vizsgáltuk, mivel nem zavarta a monoamin gátlószerek hatásának értékelését a megfelelő kontroll csoport alkalmazása miatt.

Monoamin uptake gátlók hatása a nikotin-kiváltotta [3H]NA felszabadulásra.



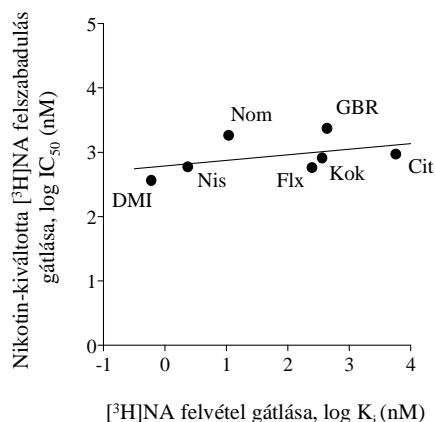
28. ábra. Különböző monoamin uptake gátlók hatása a nikotin-kiváltotta [3H]NA felszabadulásra patkány hippocampus szeletekből. Az uptake gátlók a preperfúziótól voltak jelen, a nikotint a 4. frakciótól adtuk. A gátlási értékeket az anyag jelenlétében és hiányában mérhető görbe alatti területek arányaként határoztuk meg. Az IC_{50} értékeket nem-lineáris regresszióval számítottuk ki.

A nikotin-kiváltotta választ mindegyik vizsgált szer (desipramin, nisoxetin, fluoxetin, citalopram, nomifensin, GBR-12909, kokain) dózis-függő módon gátolta a 0.03-30 μM dózis tartományban (28. ábra). A következő IC_{50} értékeket állapítottuk meg a monoamin uptake gátlókra: desipramin 0.36 μM , fluoxetin 0.57 μM , nisoxetin 0.59 μM , kokain 0.81 μM , citalopram 0.93 μM , nomifensin 1.84 μM és GBR-12909 2.32 μM . Az egyik leghatékonyabb nikotin antagonistá, a referenciavegyületként használt mekamilamin IC_{50} értéke (0.19 μM) alig különbözött a fenti értékektől.

Monoamin uptake gátlók nikotin antagonizmusa és NA felvétel gátló hatása közötti korreláció vizsgálata. Az előzőekben megfigyelt nikotin antagonista hatás és a NA felvétel gátlás közötti esetleges összefüggés vizsgálata céljából ábrázoltuk az általunk mért IC_{50} értékek logaritmusát a NA felvételre gyakorolt gátló hatás (K_i érték logaritmusa) függvényében és meghatároztuk a korrelációs koefficiens (r) (29. ábra). A K_i értékeket az irodalomból vettük (Hyttel, 1982; Andersen, 1989; Bolden-Watson és Richelson, 1993; Wong és mtsai, 1995). A Pearson-féle korreláció analízis nem mutatott ki összefüggést a két változó között (meredekség = 0.086; $r = 0.43$; $p = 0.33$, nem különbözik szignifikánsan a 0-tól).

Monoamin uptake gátlók hatása a Na^+ -áramokra patkány felső nyaki ganglion sejtekben. A Na^+ -csatornák lehetséges szerepének tisztázása céljából vizsgáltuk a monoamin uptake gátlók hatását a felső nyaki ganglion sejtekben mérhető Na^+ -áramokra. Egész sejt

patch clamp kísérletekben vizsgáltuk a desipramin, nisoxtin, citalopram, nomifensin és kokain hatását 1 és 10 μM -ban, ahol már a nikotin-kiváltotta válasz gátlása több mint 90 %-



29. ábra. A monoamin uptake gátlók szinaptoszómális $[^3\text{H}]\text{NA}$ felvételre és nikotin-kiváltotta $[^3\text{H}]\text{NA}$ felszabadulásra gyakorolt gátló hatása közötti összefüggés vizsgálata. A transzporter gátlását jellemző K_i értékeket az irodalomból vettük, a nikotin válasz gátlását jellemző IC_{50} értékeket pedig kísérleteinkben határoztuk meg. A lehetséges összefüggés vizsgálatára a Pearson-féle korreláció analízist használtuk, a szignifikancia szintet $p < 0.05$ értékben állapítottuk meg. Rövidítések: DMI: desipramin; Flx: fluoxetin; Nis: nisoxtin; Nom: nomifensin; Cit: citalopram; Kok: kokain; GBR: GBR-12909.

os. A drog adagolását megelőző kontroll áram amplitúdójához hasonlítottuk a 2 perces drog applikáció végén mérhető áram amplitúdóját és megállapítottuk a gátlás százalékos értékét. Az állandósult maximális gátlás már a 2 perces időszak vége előtt kialakult, és reverzibilisnek bizonyult, azaz kimosás után eltűnt. Egy reprezentatív kontroll és 10 μM desipramin jelenlétében mérhető áramot láthatunk a 30. ábra betétjén. Egyik anyag sem gátolta a Na^+ -áramokat 1 μM -ban és csak a desipramin okozott jelentős, 52 %-os gátlást 10 μM -ban (30. ábra).

Monoamin uptake gátlók hatása a Na^+ -áramokra patkány hippocampális sejtenyészetekben. Az előző kísérletsorozatban nem vizsgált fluoxetint és GBR-12909-et, valamint a részleges gátlást mutató desipramint tovább tanulmányoztuk a Na^+ -csatornákra gyakorolt hatásuk szempontjából. A két elektrofiziológiai munka (Mike

és mtsai, 2003; Lenkey és mtsai, 2006) részletes ismertetésére terjedelmi okokból nincs lehetőség és speciális tartalmuk miatt nincs is szükség, azonban a disszertáció témája szempontjából fontos adatok rövid ismertetésére igen. Megállapítottuk, hogy mindegyik anyag speciális állapot-függő gátlást gyakorol a Na^+ -csatornákra, melynek mértéke jelentősen függ a kísérleti körülményektől (tartófeszültség nagysága, egyszeri vagy repetitív ingerlési mintázat), így egyetlen IC_{50} értékkel nem jellemezhető. A GBR-12909 esetében a gátlás értéke függően az említett paraméterektől az 6.3-35.1 μM -os tartományban mozgott, a desipramin esetében 1.7-83.4 μM , míg a fluoxetin esetében 1.1-107.9 μM között változott (3. táblázat). Mivel az elektrofiziológiai adatok nem adtak egyértelmű választ a Na^+ -csatornák esetleges érintettségére, a kérdés tisztázása érdekében további vizsgálatokra volt szükség.

Monoamin uptake gátlók és TTX hatásának összehasonlítása a nikotin illetve elektromos ingerlés-kiváltotta $[^3\text{H}]\text{NA}$ felszabadulásra. Amennyiben a monoamin uptake

Anyag	Tartófeszültség (mV)	Ingerlési mintázat	IC ₅₀ (μM)
GBR-12909	-70	Egyszeri: 10 ms	17.3
	-150		35.1
	-70	Sorozat: 10 ms, 10 Hz, 25 pulzus	6.3
	-150		29.6
Desipramin	-150	Sorozat: 10 ms, 10 Hz, 10 pulzus	83.4
	-120		56.7
	-90		33.3
	-60		1.7
Fluoxetin	-150	Sorozat: 10 ms, 10 Hz, 10 pulzus	107.9
	-120		74.1
	-90		23.9
	-60		1.1

3. táblázat. Monoamin uptake gátlók hatása a Na⁺-áramokra patkány hippocampális sejtenyészetekben. A Na⁺-áramokat egy vagy több 10 ms-os tartófeszültség lépéssel váltottuk ki, mely a táblázatban szereplő tartófeszültségről indult és -20 mV-ra érkezett. A dózis-hatás görbéket legalább 5 különböző koncentráció alapján készítettük, az IC₅₀ értékeket nem-lineáris regresszióval számítottuk ki.

mind az elektromos ingerlés-kiváltotta [³H]NA felszabadulást egyforma hatékonysággal gátolta, az IC₅₀ értékek 0.033 és 0.039 μM voltak. Az uptake gátlók ezzel szemben csak a nikotin-kiváltotta választ gátolták, viszont nem befolyásolták az elektromos ingerlés-kiváltotta választ (31. ábra). Az ábrán az áttekinthetőség kedvéért csak a desipraminos adatokat ábrázoltuk, de teljesen azonos görbéket kaptunk a fluoxetinnel és GBR-12909-cel kapcsolatban is, tehát még 30 μM-ban sem gyakoroltak semmilyen gátló hatást az elektromos ingerlés-kiváltotta [³H]NA felszabadulásra. Megjegyzendő, hogy a desipramin eltérően a két másik uptake gátlótól, még potenciózta is az elektromos ingerlés-kiváltotta választ (nincs ábrázolva), ami a NET-re gyakorolt gátló hatásával magyarázható.

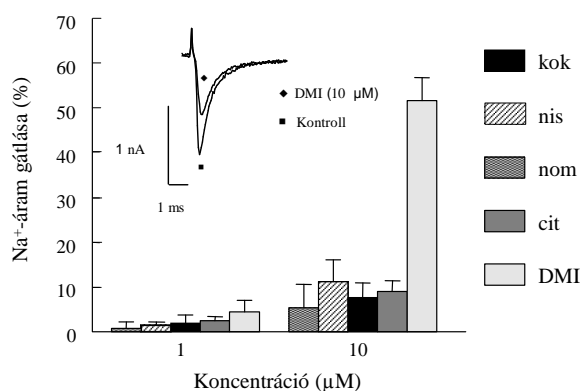
5.3.2. Az eredmények értelmezése: nAChR-ok szerepe a depresszió kórélettanában

Kísérleteink legfontosabb eredménye, hogy a különböző kémiai struktúrával és szelektivitással rendelkező monoamin uptake gátlók (Fielding és Szewczak, 1984; Andersen és mtsai, 1989; Bolden-Watson és Richelson, 1993, Wong és mtsai, 1995). kivétel nélkül dózis-függő módon gátolták a nikotin-kiváltotta NA felszabadulást hippocampus szeletekből. A számított IC₅₀ értékek az alacsony mikromólos koncentráció-tartományban mozogtak, ami azt jelenti, hogy csaknem olyan hatékonyan gátolták a nAChR közvetítette választ, mint az egyik leghatékonyabb nikotin antagonista, a mekamilamin.

gátlók a Na⁺-csatorna gátlásán keresztül függesztik fel a nikotin-kiváltotta [³H]NA felszabadulást, hasonló módon kell viselkedniük, mint a Na⁺-csatorna gátló TTX-nek. A vizsgálatokba azt a 3 monoamin uptake gátlót (desipramin, fluoxetin, GBR-12909) vontuk be, melyeknél az elektrofiziológiai adatok alapján felmerült a Na⁺-csatorna gátlás lehetősége.

A TTX mind a nikotin,

Bizonyos monoamin uptake gátlókkal (desipramin, nisoxtin, kokain) kapcsolatban már régóta ismert volt, hogy befolyásolhatják a nAChR működését. Megfigyelték, hogy a



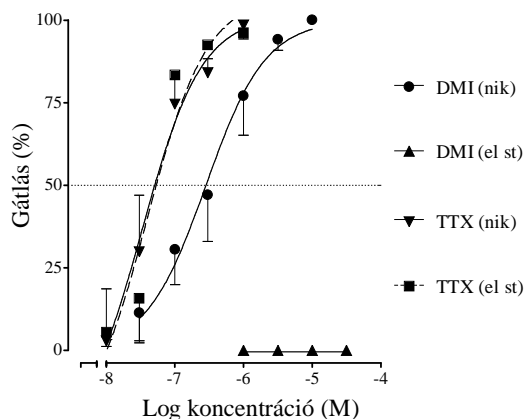
30. ábra. Monoamin uptake gátlók hatása a Na^+ -áramokra patkány ganglion cervicale superiorból preparált szimpatikus idegsejteken végzett egész sejt patch clamp kísérletekben. A hisztogram az anyagok maximális gátlási értékeit mutatja, minden oszlop 5 kísérlet átlagát és standard hibáját ábrázolja. A betét ábra egy reprezentatív kontroll Na^+ -áramot illetve annak 10 μM desipramin általi gátlását mutatja. Rövidítések: Kok: kokain; Nis: nisoxtin; Nom: nomifensin; Cit: citalopram; DMI: desipramin.

megfigyelhető viselkedési hatásait (görcsök, tremor) gátolta a kokain és analógjai (Lerner-Marmarosh és mtsai, 1995). A desipramin és imipramin gátolta a nikotin-kiváltotta áramokat kromaffin sejtekben (Izaguirre és mtsai, 1997). Saját eredményeink megerősítik e megfigyeléseket, ugyanakkor ki is terjesztik a funkcionális nikotin antagonistaként viselkedő monoamin uptake gátlók körét.

Mindazonáltal, a nikotinra adott válasz gátlása még nem jelenti feltétlenül, hogy az adott szer közvetlenül a nAChR-t gátolja, a hatás lehet indirekt is. Felmerült korábban, hogy a nikotin NA felszabadulásra kifejtett hatása csak ép és működő NA uptake mellett lehetséges (Su és Bevan, 1970), vagyis hogy a funkcionális nAChR antagonizmus a NA transzporterén, esetlegesen annak gátlásán keresztül közvetítődik. Ha ez a helyzet, akkor viszont korrelációnak kellene fennállnia a NA felvételre illetve a nikotin-kiváltotta válaszra gyakorolt gátló hatás között. A feltételezés ellenőrzése céljából összevetettük a monoamin uptake gátlók általunk mért IC_{50} értékeit e szerek NA felvételre gyakorolt gátló hatásával. Az uptake gátlók K_i értékeit az irodalomból vettük (Hyttel 1982; Andersen, 1989; Bolden-Watson és Richardson, 1993; Wong és mtsai, 1995). A Pearson-féle korreláció analízis nem mutatott összefüggést a K_i és az IC_{50} értékek között (29. ábra), azt jelezve hogy a NA transzporter nem vesz részt a monoamin uptake gátlók nAChR antagonista hatásának kialakulásában. Ezt a

desipramin és a kokain gátolja a nikotin-kiváltotta $[^3\text{H}]\text{NA}$ felszabadulást nyúl pulmonáris artéria szeletekből (Su és Bevan, 1988). A nikotin-kiváltotta NA felszabadulást gátolta a desipramin és nisoxtin tengeri malac izolált szív preparátumából (Richardt és mtsai, 1988). A desipramin gátolta a DMPP-kiváltotta depolarizációt és NA felszabadulást SH-SY5Y neuroblastoma sejtekből (Vaughan és mtsai, 1993). Ugyanezen a sejtvonalon bizonyították, hogy a desipramin és az imipramin non-kompetitív módon gátolja a nAChR-közvetítette áramokat (Rana és mtsai, 1993). A nikotin egérben

következtetésünket alátámasztja azon korábban részletesen ismertetett eredményünk is, miszerint a nomifensin 1 μM -os koncentrációban szinte teljes mértékben gátolta a DMPP-kiváltotta NA felszabadulás carrier-mediálta komponensét (2. fázis), de nem befolyásolta a



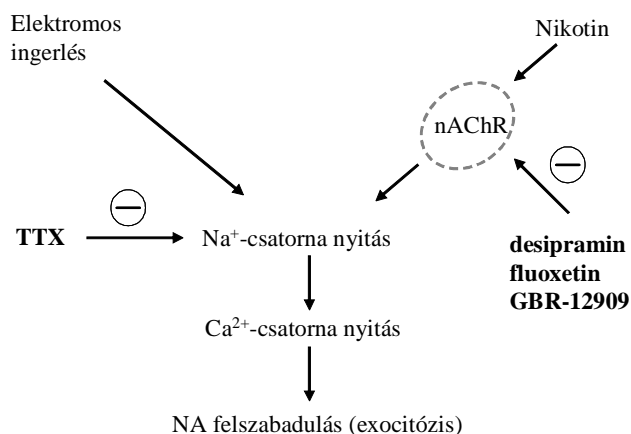
31. ábra. A desipramin (DMI) és a tetrodotoxin (TTX) nikotin- illetve elektromos ingerlés-kiváltotta [^3H]NA felszabadulásra kiváltott hatásának összehasonlítása patkány hippocampus szeletekben. A pontozott vonal az 50 %-os gátlást reprezentálja. Az IC_{50} értékeket nem-lineáris regresszióval számítottuk ki. Rövidítések: nik: nikotin-kiváltotta felszabadulás. El st: elektromos ingerlés-kiváltotta felszabadulás.

nAChR-közvetítette 1. fázist (Kiss és mtsai, 1997), bizonyítva, hogy a transzporterre kifejtett hatás független a nAChR-ra gyakorolttól. A monoamin uptake gátlók másik lehetséges célpontja a feszültségfüggő Na^+ -csatorna lehet. A desipramin és imipramin gátolni képes a gyors Na^+ -áramokat különböző idegsejt preparátumokban (Ogata és mtsai, 1989, Deffois és mtsai, 1996, Pancrazio és mtsai, 1998). A GBR-12909-cel kapcsolatban megfigyelték, hogy nagy affinitással kötődik a Na^+ -csatornához (Andersen, 1989). Mivel korábban bizonyítottuk, hogy a nikotin-kiváltotta NA felszabadulás TTX-érzékeny folyamat (Vizi és mtsai, 1995; Kiss és mtsai, 1997; Sershen és mtsai, 1997), a Na^+ -csatornák

esetleges érintettségét mindenképpen vizsgálnunk kellett. A kérdést először egész sejt patch clamp technika segítségével tanulmányoztuk különböző preparátumokon. A ganglion cervicale superior sejtekkel folytatott kísérletekben csak a desipramin esetében figyeltünk meg érdemleges Na^+ -csatorna gátló hatást, a hippocampális sejtenyészetekkel folytatott vizsgálatainkban viszont azt találtuk, hogy a desipraminon kívül a fluoxetin és GBR-12909 is képes a Na^+ -csatorna gátlására, azonban a hatás erőssége jelentősen függ a vizsgálatban alkalmazott ingerlési protokolltól (egyszeri vagy többszörös ingerlés, tartófeszültség értéke). Mivel meglehetősen nehéz megállapítani milyen ingerlési protokoll modellezné legjobban a nikotin ingerlés viszonyait, patch clamp vizsgálatokkal nem tudtunk egyértelmű választ adni a kérdésre, ezért további vizsgálatokat kellett végeznünk.

Amennyiben a monoamin uptake gátlók a Na^+ -csatornák gátlásán keresztül függesztik fel a nikotin-kiváltotta NA felszabadulást, gátolniuk kellene az elektromos ingerlés-kiváltotta transzmitter kiáramlást is. Adataink viszont azt mutatják, hogy az uptake gátlók csak a nikotin-kiváltotta választ függesztik fel, viszont nem befolyásolják az elektromos ingerlés-kiváltotta választ. Ez esetleg magyarázható lenne azzal is, hogy a különböző ingerlési

módozatok esetén más és más a Na^+ -csatornák szerepe, azonban kísérleti adataink cáfolják ezt a feltételezést, hiszen a Na^+ -csatorna gátló TTX egyforma hatékonysággal gátolja mindkét ingerlési formát. Mindez arra utal, hogy a Na^+ -csatornák nem játszanak szerepet a monoamin uptake gátlók nAChR antagonistá hatásában. Ennél azonban többet is megtudhatunk a TTX-es kísérletekből. A nikotin-kiváltotta NA felszabadulás első lépése a nAChR aktiválódása az agonista jelenlétében, ami megnyitja a receptor ioncsatornáját és kationok belépését teszi lehetővé a sejtbe. Ez egy kezdeti, kisebb mértékű membrádepolarizációt okoz, ami aktiválja



32. ábra. A tetrodotoxin (TTX) és a monoamin uptake gátlók hatásmechanizmusának összehasonlítása. A nikotinos ingerlés esetén először a nikotin receptorok (nAChR) aktiválódnak, ami egy kezdeti depolarizációt és ezáltal a feszültségfüggő Na^+ -csatornák megnyílását idézi elő. Ez a további depolarizáció révén megnyitja a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornákat, ami a NA-tartalmú vezikulák kiürülését (exocitózis) eredményezi. Az elektromos ingerlés közvetlenül aktiválja a Na^+ -csatornákat, de ettől a lépéstől kezdve a további események azonosak a nikotinnál leírtakkal. A TTX mindkét ingerlési fajtát gátolja, hiszen a Na^+ -csatornák mindkét folyamatban szerepet játszanak. Ezzel szemben a monoamin uptake gátlók csak a nikotin-kiváltotta felszabadulást gátolják, ami azt jelenti, hogy támadáspontjuk csak a Na^+ -csatornák kinyílása előtti eseménnyel lehet kapcsolatos. Mivel a megelőző lépés a nAChR-ok aktiválódása, eredményeink azt mutatják, hogy a monoamin uptake gátlók közvetlenül a nAChR gátlásával fejtik ki hatásukat.

a feszültségfüggő Na^+ -csatornákat és így további depolarizációhoz vezet. Ezután már a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák is aktiválódnak, ami végeredményben kiváltja a vezikuláris exocitózist (32. ábra). Világos, hogy a Na^+ -csatornák aktiválódásától kezdve az elektromos stimuláció és a nikotin által kiváltott folyamat ugyanazon az ösvényen halad tovább. A nikotin-kiváltotta felszabadulás szelektív gátlása ezért egyértelműen kizárja mind a Na^+ -csatornák, mind a későbbi események lehetséges érintettségét. Mivel a Na^+ -csatornák megnyílását megelőző

lépés a nAChR-ok aktiválódása, eredményeink arra utalnak, hogy a monoamin uptake gátlók közvetlenül a nAChR-ok gátlása révén fejtik ki hatásukat, tehát nemcsak funkcionális, hanem tényleges nikotin antagonistá vegyületek.

A nAChR gátlásának mechanizmusát nem vizsgáltuk, de az irodalom alapján nagy valószínűséggel válaszolhatunk erre a kérdésre is. Kimutatták, hogy a desipramin nagy affinitással kötődik a nAChR ioncsatornájába (Aronstam, 1981). Ez a csatornán belül elhelyezkedő kötőhely a célpontja a non-kompetitív nAChR antagonistá mekamilaminnak is (Banerjee és mtsai, 1990). A monoamin uptake gátlók kölcsönhatását a mekamilamin

kötőhellyel más megfigyelések is alátámasztják. A kokain és analógjai antagonizálták a nikotin viselkedési hatásait és nagy affinitással versengtek a mekamilamin kötőhelyért receptor kötési kísérletekben (Lerner-Marmarosh és mtsai, 1995). Elektrofiziológiai kísérletek adatai szerint a fluoxetin a nAChR ioncsatornájába kötődve gátolni képes a receptor közvetítette áramokat (Garcia-Colunga és mtsai, 1997; Maggi és mtsai, 1998). Egy másik csoport négy további monoamin uptake gátlóról, az SSRI sertralinról és paroxetinről, illetve az SNRI nefazodonról és venlafaxinról jelentette, hogy non-kompetitív módon gátolják a nAChR-t (Fryer és Lucas, 1999a). Az elmúlt évtizedben számos, egymástól független munkacsoport számolt be hasonló nAChR gátló tulajdonságról más monoamin uptake gátlókkal (imipramin, amytropylin, bupropion, reboxetin) kapcsolatban (Izaguirre és mtsai, 1997; Park és mtsai, 1998; Fryer és Lucas, 1999b; Slemmer és mtsai, 2000; Miller és mtsai, 2002). Ezek a megfigyelések egyértelműen azt bizonyítják, hogy a monoamin uptake gátlók kémiai szerkezetüktől és szelektivitásuktól függetlenül gátolni képesek a nAChR-okat, nagy valószínűséggel a mekamilaminéhoz hasonló non-kompetitív csatornablokkoló mechanizmussal.

Saját eredményeink és az irodalmi adatok azt mutatják tehát, hogy a nAChR antagonizmus a monoamin uptake gátló vegyületek általános tulajdonsága. Mi lehet a magyarázata ennek a meglepő jelenségnek? Az egyre gyarapodó megfigyelések szerint a monoamin transzporterek rendelkeznek bizonyos csatorna-tulajdonságokkal (Lester és mtsai, 1996, Sonders és Amara, 1996, Sonders és mtsai, 1997). Kimutatták, hogy a NA neuronális visszavételéhez nem sztöchiometrikus ionáramok kapcsolódnak, melyeket gátolni lehet kokainnal és egyéb uptake inhibitorokkal (Galli és mtsai, 1995). Érdekes megfigyelés, hogy a DAT csatorna mechanizmussal depolarizálja a neuronokat, és a DA felvétellel párosuló csatorna aktivitás szelektív DA uptake gátlókkal megakadályozható (Carvelli és mtsai, 2004). Ezek az eredmények alátámasztják azt az elképzelést, hogy funkcionális szempontból fontos csatornák találhatók a monoamin transzporterekben (DeFelice és Blakely, 1996; Sulzer és Galli, 2003), és e csatornák gátlása lenne a hatásmechanizmusa az uptake gátló vegyületeknek. Érdekes módon a legfrissebb eredmények további bizonyítékot szolgáltatnak a javasolt gátlási mechanizmusra. Kimutatták, hogy a triciklikus antidepresszánsok a bakteriális leucin transzporter csatornaszerű struktúrájába kötődve fejtik ki gátló hatásukat, és ez a fehérje a monoamin transzporterek bakteriális homológjának tekinthető (Singh és mtsai, 2007; Zhou és mtsai, 2007). Ha feltételezünk bizonyos struktúrális hasonlóságot a transzporterekben és a nAChR-okban található csatornák között, a monoamin uptake gátlók nAChR antagonista tulajdonsága könnyen érthetővé válik. Az általunk javasolt modell

alapján megjósolható, hogy a nAChR csatornablokkoló típusú antagonistáinak gátolnia kell a monoamin transzportereket is. Valóban, a csoportunkban jelenleg folyó szinaptoszómális uptake kísérletekben azt találtuk, hogy a mekamilamin gátolja a monoamin visszavételt (nem közölt megfigyelés), mindazonáltal további vizsgálatok szükségesek az elképzelés igazolásához.

Van-e klinikai jelentősége eredményeinknek? A depressziós betegeken folytatott vizsgálatok szerint a monoamin uptake gátló típusú antidepresszánsok plazmakoncentrációja 1-2 μM (Muscettola és mtsai, 1978; Hyttel, 1982; Pato és mtsai, 1991; Besret és mtsai, 1996). Tekintettel arra, hogy az agyi antidepresszáns koncentráció a felhalmozódási folyamatok miatt magasabb, mint a plazmaszint (Besret és mtsai, 1996), ezek az anyagok könnyen elérhetnek olyan agyi koncentrációt az antidepresszáns kezelés során, melynél már jelentősen gátolni képesek a központi idegrendszer nAChR-ait. Mivel ezek a receptorok központi szerepet játszanak számos magasabb rendű agyi folyamatban (Newhouse és mtsai, 1997; Levin és Simon, 1998; Steinlein, 1998), a monoamin uptake gátló típusú antidepresszánsok hatása a nAChR-ra hozzájárulhat e szerek terápiás, illetve mellékhatásainak kialakulásához.

Az elmúlt időszakban, jelentős mértékben csoportunk eredményeire is támaszkodva, megszületett a depresszió neurokémiai hátterének egy új típusú elmélete, mely központi szerepet tulajdonít a nAChR-oknak (Shytle és mtsai, 2002). Az elmélet arra a régi megfigyelésre épít, miszerint a depressziós betegeken kolinerg túlsúly figyelhető meg a visszaszorult monoaminerg aktivitás mellett. A szerzők szerint a kolinerg túlsúllyal járó depressziós tünetek kialakulásáért a központi idegrendszer neuronális nAChR-ainak túlingerlődése a felelős. Valóban, a nAChR-ok fontos szerepet játszanak a hipotalamusz-hipofízis tengely működésében, a mezolimbikus dopaminerg rendszer szabályozásában, illetve a circadian ritmus kialakításában és fenntartásában (részletes referenciákért ld. Shytle és mtsai, 2002). Mindezek a funkciók, illetve ezek zavara jelentős tényező a depresszió kialakulásában. A szerzők elgondolása szerint az antidepresszáns hatás kifejlődésének döntő lépése a túlingerelt nAChR-ok gátlása, amit a jelenleg használt antidepresszánsok meg is tudnak tenni (ld. eredményeinket és az irodalmi adatokat). Az elképzelés szerint a nAChR antagonistáknak képesek lehetnek a depressziós tünetek enyhítésére, amit a mekamilaminnal folytatott klinikai vizsgálatok meg is erősítettek (Shytle és mtsai, 2000). Az elmélet alapján már fejlesztés alatt is vannak bizonyos nikotin antagonistáknak, melyek az antidepresszánsok egy új csoportját alkothatják.

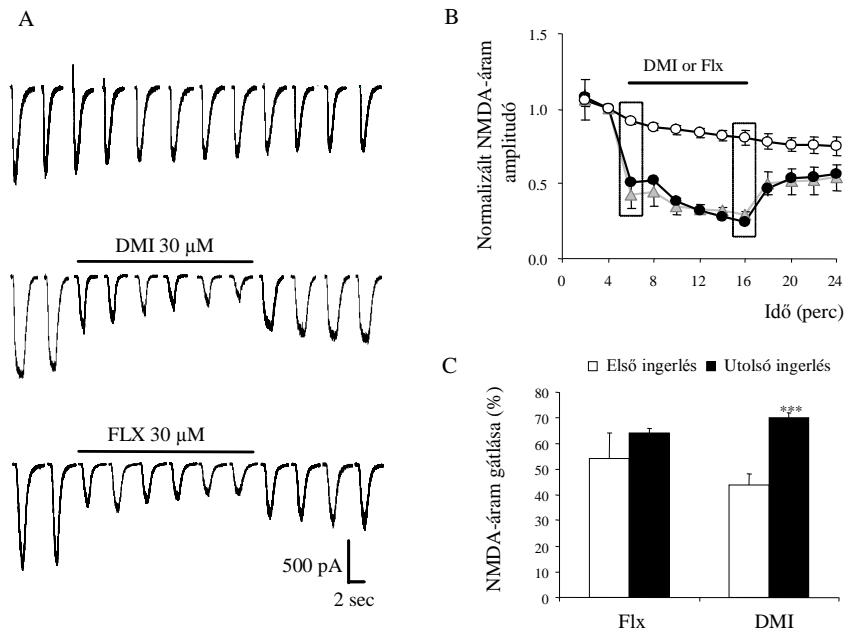
5.3.3. Monoamin uptake gátló típusú antidepresszánsok hatása a központi idegrendszer NMDA receptoraira

Habár struktúrájuk különbözik, az NMDA receptorok bizonyos farmakológiai tulajdonságaikban hasonlóságot mutatnak a nAChR-okkal. A csatornablokkoló nAChR antagonisták mekamilamin gátolja az NMDA receptorokat (Snell és Johnson, 1989), míg a csatornablokkoló NMDA receptor antagonisták MK-801 gátolja a nAChR-okat (Ramoja és mtsai, 1990). Mint ahogy azt az előzőekben láthattuk, a monoamin uptake inhibitorok csatornablokkoló antagonistaként képesek gátolni a központi idegrendszer nAChR-ait, ezért felvetődött az a lehetőség, hogy hatással lehetnek az NMDA receptorokra is. Valóban, triciklikus antidepresszánsokkal kapcsolatban meg is figyeltek ilyen hatást (Sernagor és mtsai, 1989; Cai és mtsai, 1992; Watanabe és mtsai, 1993), azonban e vegyületek közismerten sokféle receptorral lépnek kölcsönhatásba, így az NMDA receptorokra gyakorolt hatásuknak nem tulajdonítottak nagy jelentőséget. A következő kísérletsorozatban elektrofiziológiai (egész sejt patch clamp) módszerek segítségével azt kívántuk megvizsgálni, vajon az NMDA antagonizmus az uptake gátlók szélesebb körére érvényes tulajdonság lehet-e, vagy csak a triciklikusok sajátja, ezért összevetettük a triciklikus desipramin és sokkal kevesebb receptor kölcsönhatással rendelkező SSRI vegyület, a fluoxetin hatását az NMDA receptorokra.

Monoamin uptake gátlók hatása az NMDA áramokra patkány kortikális sejttenyészetben: lassú perfúziós protokoll. A szövetkamrában elhelyezkedő 7-21 napos tenyészetből származó kortikális sejteket folyamatosan perfundáltuk és 2 percenként, 1 mp-ig tartó 10 μM -os NMDA impulzusnak tettük ki (Mg^{2+} -mentes közegben). A kiváltott befelé irányuló áramok átlagos amplitúdója $-523.47 \pm 40.95 \text{ pA}$ ($n = 59$) volt (33A. ábra). Az NMDA áramok amplitúdója 12 perc (6 stimulus) alatt $80.54 \pm 4.5 \%$ -ra csökkent (33B. ábra). Az uptake gátlók kezdő koncentrációját (30 μM) irodalmi adatok alapján választottuk meg, korábbi munkákban ugyanis a desipramin a 20-50 μM -os koncentráció-tartományban gátolta az NMDA receptorokat (Sernagor és mtsai, 1989). A fluoxetin és desipramin 12 perces perfúziója szignifikánsan csökkentette az NMDA áramokat (33B. ábra). Noha mindkét szer hasonló hatékonysággal gátolta az NMDA-kiváltotta választ, a hatás kifejlődésének időlefutása különböző volt. A desipramin gátló hatása erősödött, $44.31 \pm 3.55 \%$ volt az első NMDA impulzusnál és szignifikánsan magasabb, $70.16 \pm 2.27 \%$ volt az utolsó, hatodik impulzusnál ($p < 0.001$, kétirányú t-próba). Ezzel szemben a fluoxetin gátló hatása viszonylag állandó volt, $53.76 \pm 9.82 \%$ az első impulzusnál és $63.56 \pm 2.07 \%$ az utolsónál, a különbség nem volt szignifikáns (33C. ábra). A kontroll NMDA áramok folyamatos

csökkenésének (rundown) kompenzálása érdekében a gátlás értéke mindig a megfelelő kontroll áram százalékában volt kifejezve (ld. a pontozott téglalapokat a 33B. ábrán).

Monoamin uptake gátlók hatása az NMDA áramokra patkány kortikális sejttényészeten: gyors anyagadási protokoll. A fluoxetin és desipramin hatása közötti

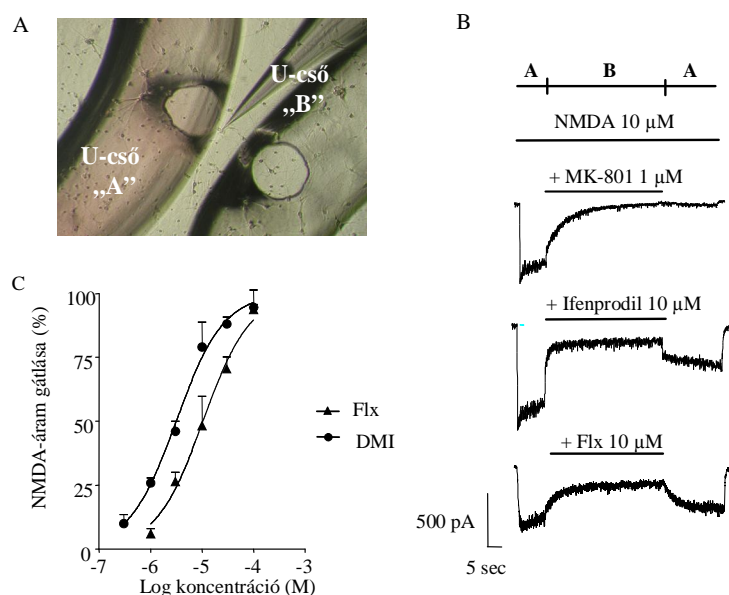


33. ábra. Desipramin (DMI) és fluoxetin (Flx) hatása az NMDA-áramokra patkány kortikális sejttényészeten (lassú perfúziós protokoll). A: Az egész sejt patch clamp kísérletekben az 1 másodperces, 10 μ M-os NMDA impulzusokat 2 percenként adtuk. A felső rögzítés a kontroll, a középső a DMI (30 μ M), az alsó a Flx (30 μ M) jelenlétében mérhető áramokat mutatja. Az uptake gátlókat 12 perc (6 ingerlés) után eltávolítottuk (washout). B: A normalizált NMDA-áramok DMI (30 μ M; n = 6, kitöltött kör) és FLX (30 μ M; n = 5, háromszög) általi gátlása. A második kontroll áramot (üres kör) vettük 100 %-nak és minden további választ ennek arányában fejeztünk ki. C: A gátlás időfüggése. Az oszlopdiagram az uptake gátlók jelenlétében mérhető gátlásokat hasonlítja össze az első és az utolsó (6.) NMDA áram esetében. A gátlási értékeket a megfelelő kontroll sorozathoz képest határoztuk meg (ld. a pontozott négyzeteket) az NMDA válasz időbeli gyengülésének (rundown) kompenzálása érdekében. A statisztikai elemzéshez kétutas t-próbát használtunk (***) $p < 0.001$)

körülmények között az NMDA áramok lecsengési ideje (offset rate) 284 ± 15 ms volt, és a válasz szinte teljes mértékben (97.57 ± 0.94 %, n = 5) gátolható volt az NMDA antagonista MK-801-gyel (1 μ M) és igen erőteljesen (76.05 ± 6.05 %, n = 9) gátolható volt az NR2B antagonista ifenprodillal (10 μ M) (34B. ábra). Mind az offset rate, mind az ifenprodil érzékenység azt mutatja, hogy az NMDA válasz elsősorban NR2B alegység tartalmú NMDA receptorokon keresztül közvetítődött. Mindkét antidepresszáns dózis-függő módon gátolta a befelé irányuló NMDA áramokat, az IC_{50} értékek az alacsony mikromólos koncentráció-tartományban mozogtak, a desipramin esetén 3.13 μ M ($n_H = 0.95$), míg a fluoxetin esetén 10.51 μ M ($n_H = 1.02$) értéket mértünk (34C. ábra).

különbségek tanulmányozása céljából egy gyors anyagadási rendszert használtunk a további kísérletekben. Két, üvegből készült ún. U-csövet helyeztünk a pipettavégen rögzített sejt közelébe (34A. ábra), és a következő anyagadási protokollt használtuk: NMDA (10 μ M) 10 mp-ig (A cső), antagonisták, illetve antidepresszánsok és NMDA 40 mp-ig (B cső), majd ismét csak NMDA 20 mp-ig (A cső). Ilyen kísérleti

A monoamin uptake gátlók hatásának feszültségfüggése. A gátlás mechanizmusának felderítése érdekében vizsgáltuk az antidepresszánsok hatásának feszültségfüggését. A méréseket -80, -50, -30, +10 és +40 mV tartófeszültségen végeztük 30 μ M-os antidepresszáns



34. ábra. Desipramin (DMI) és fluoxetin (Flx) hatása az NMDA-áramokra patkány kortikális sejtenyészethen (gyors anyagadási protokoll) A: Az oldatokat két házi készítésű U-cső segítségével cseréltük a sejtek közvetlen környezetében. B: A sejtek 10 s-ig csak NMDA-t kaptak 10 μ M-ban (A-cső), majd 40 s-ig NMDA-t és a vizsgált anyagot (B-cső), végül 20 s-ig ismét csak NMDA-t (A-cső). Alul a fenti protokollal készült reprezentatív válaszgörbék láthatunk, melyek az NMDA antagonisták MK-801 (1 μ M), az NR2B (10 μ M) antagonisták ifenprodil és a fluoxetin (10 μ M) hatását mutatják. C: A desipramin és fluoxetin NMDA-áramokra gyakorolt gátlásának dózis-hatás görbéi. Az IC_{50} értékeket nem-lineáris regresszióval határoztuk meg.

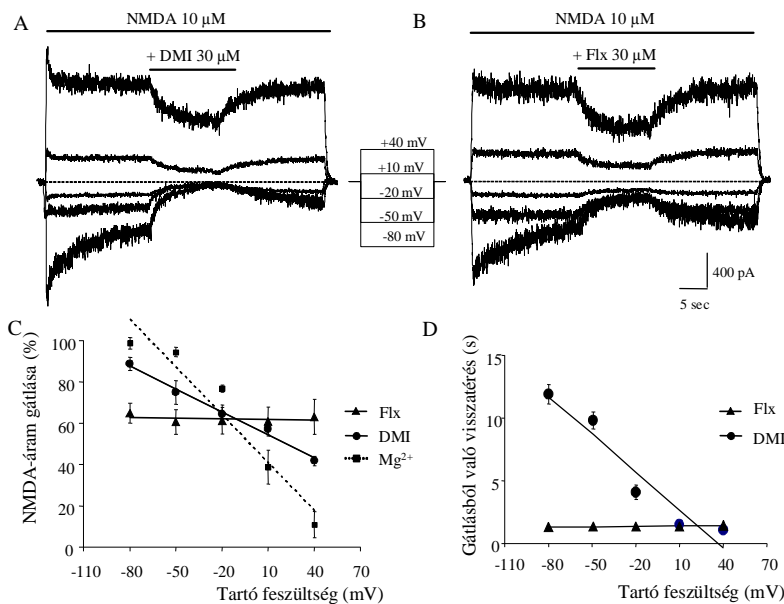
teljes gátlást produkálva -80 mV-on, és egyre kisebb hatást kifejtve a membrán depolarizációjakor. Ugyanakkor a Mg^{2+} -mal ellentétben, mely teljesen elveszítette hatását +40 mV-on, a desipramin még itt is szignifikáns (43 %-os) gátlást okozott (35A,C. ábra). A gátlást a feszültség függvényében ábrázolva a kapott görbe meredeksége szignifikánsan különbözött a 0-tól (a Pearson-féle korreláció analízis alapján $r^2 = 0.98$, $p < 0.001$, $n = 6$) statisztikailag is igazolva a feszültségfüggést. Ezzel szemben a fluoxetin gátlási hatékonysága nem függött a membránpotenciáltól, mind negatív, mind pozitív tartófeszültség esetén 61 és 65 % között mozgott (35B,C. ábra). A görbe meredeksége nem különbözött szignifikánsan a 0-tól ($r^2 = 0.004$, $p = 0.63$, $n = 6$).

A kötőhely elhelyezkedésének vizsgálata a Woodhull-modell segítségével. A Woodhull-modell szerint egy adott antagonisták gátlásának feszültségfüggése korrelál az antagonisták kötőhelyének elhelyezkedésével a membrán elektromos mezejében (Woodhull,

koncentráció mellett. Mivel ekkor a hatás gyorsabban kialakul, némileg módosítottuk az anyagadási protokollt (15 s, 10 s, 15 s) annak érdekében, hogy egyetlen sejten végigmérhessünk az összes tartófeszültségen. A magnézium (Mg^{2+}) jól ismert csatornablokkolója az NMDA receptornak. Az 5 mM Mg^{2+} által kifejtett gátlás erős feszültségfüggést mutatott (35C. ábra). A desipramin szintén egyértelműen feszültségfüggő módon gátolta az NMDA áramokat, csaknem

1973). Az elhelyezkedés az elektromos távolsággal (δ) jellemezhető, mely arányszám 0 és 1 között változhat, és azt fejezi ki, hogy az adott antagonisták mekkora hányadát érzékeli a membránpotenciálnak. Ilyenformán az 1 az intracelluláris oldalon elhelyezkedő kötőhelyet jelenti, a 0 pedig az extracelluláris oldalon lévő. A Woodhull-egyenlet alapján meghatároztuk a Mg^{2+} illetve az antidepresszánsok elektromos távolságát. A Mg^{2+} esetében 0.71-et kaptunk a δ értékeként, mely egy, az NMDA receptor csatornájában mélyen elhelyezkedő, az intracelluláris oldalhoz közeli kötőhelyet jelent és szép egyezést mutat korábbi irodalmi adatokkal (Li-Smerin és Johnson, 1996). A desipramin esetében a δ 0.44 volt, míg a fluoxetin esetében 0.01. Adataink arra utalnak, hogy a desipramin és a fluoxetin különböző kötőhelyeken kapcsolódnak az NMDA receptorhoz, a desipramin a receptor pórusában, míg a fluoxetin felületesen, az extracelluláris oldalon.

A gátlásból való visszatérési idő feszültségfüggése. A különbségek további



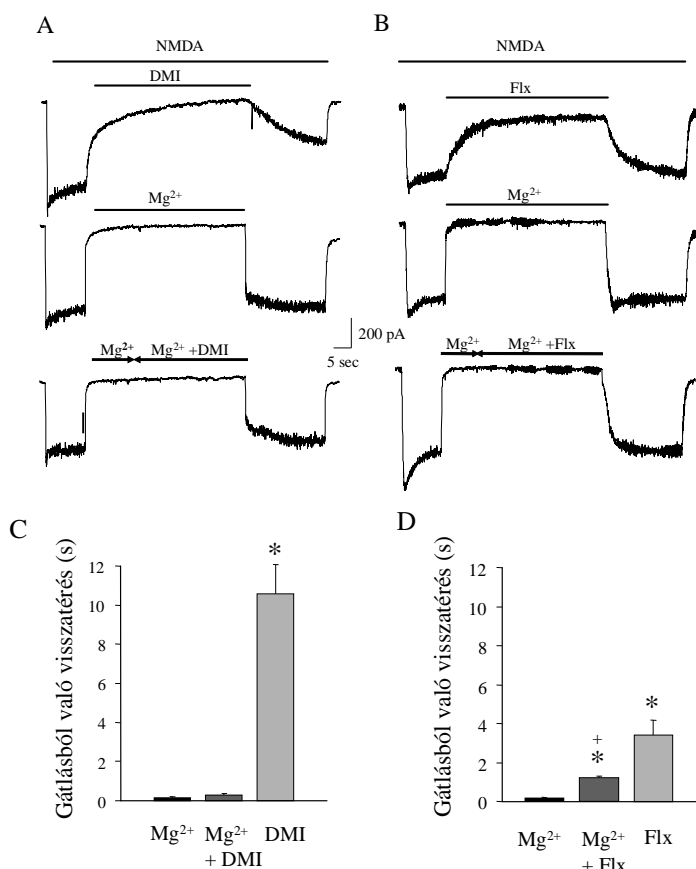
35. ábra. A desipramin és fluoxetin NMDA-áramokra gyakorolt gátló hatásának feszültségfüggése. A méréseket ugyanazon sejten, de különböző membránpotenciálokon (-80 és +40 mV között) végeztük. A pontozott vonal a 0 áramot jelöli. Mindkét anyagot 30 μM -ban vizsgáltuk. A felső panelek reprezentatív méréseket mutatnak be a desipramin (A) ill. fluoxetin (B) esetén. A feszültségfüggés összesített adatait a C ábra tartalmazza. A pontozott vonal a Mg^{2+} gátló hatásának feszültségfüggését ábrázolja. A gátlásból való visszatérés időállandójának feszültségfüggését a D ábra mutatja. A visszatérési időállandót (τ_{offset}) exponenciális görbeillesztéssel határoztuk meg. A C és D ábrán minden pont 5-6 független mérés átlagát és standard hibáját képviseli. A feszültségfüggést a Pearson-féle korreláció analízissel vizsgáltuk.

szigorúan feszültségfüggő volt, a görbe meredeksége szignifikánsan különbözött a 0-tól ($r^2 = 0,68$, $p < 0.001$). Ezzel szemben a fluoxetin (30 μM) által okozott gátlásból való visszatérés

tanulmányozása érdekében meghatároztuk az antidepresszánsok gátlásból való visszatérési időállandót is (rate of recovery, τ_{offset}). Exponenciális görbéket illesztettünk a kimosás utáni visszatérési fázisokhoz és az időállandókat ábrázoltuk a tartófeszültség (-80, -50, -30, +10, vagy +40 mV) függvényében (35D. ábra). A desipramin (30 μM) esetében a depolarizáció felgyorsította a gátlásból való visszatérést. A gyorsulás

nem mutatott feszültségfüggést, az időállandó nem függött a membránpotenciáltól. A görbe meredeksége nem különbözött szignifikánsan a 0-tól ($r^2 = 0.93$, $p > 0.001$).

Mg²⁺ hatása az antidepresszánsok és az NMDA receptor interakciójára. Mivel a Mg²⁺ nyitott csatorna blokkolóként gátolja az NMDA receptort, felmerül a kérdés, vajon a fluoxetin és a desipramin képes-e asszociálódni a receptorral Mg²⁺ jelenlétében. Ezért



36. ábra. A desipramin (DMI) és fluoxetin (Flx) NMDA-áramokra gyakorolt hatása Mg²⁺ jelenlétében. A protokoll szerint 10 s-ig csak NMDA-t (10 μM) adtunk majd 40 s-ig NMDA-t és a vizsgált anyagot (Mg²⁺ 5 mM, desipramin vagy fluoxetin 30 μM). Mikor a Mg²⁺ és az antidepresszánsok kölcsönhatását vizsgáltuk, a desipramint (A) vagy fluoxetint (B) 10 s-mal a Mg²⁺ adása után kezdtük adni. A visszatérési időállandót (τ_{offset}) exponenciális görbeillesztéssel határoztuk meg. Minden oszlop 4-6 független mérés átlagát és standard hibáját képviseli. Az adatokat ANOVA-t követő Tukey-Kramer teszt segítségével elemeztük (* $p < 0.05$ a Mg²⁺-hoz képest, + $p < 0.05$ a fluoxetinhez képest).

megvizsgáltuk a gátlásból való visszatérés időállandóját (τ_{offset}) mindkét antidepresszáns esetén Mg²⁺ jelenlétében, illetve hiányában (36. ábra). Ha csak a Mg²⁺ (5 mM) által okozott gátlásból való visszatérést vizsgáltuk, a folyamat nagyon gyors volt (τ_{offset} = 459 ± 80 ms -70 mV-on). Az antidepresszánsok gátló hatása sokkal lassabban múlt el, a desipramin (30 μM) esetén szignifikánsan lassabb volt a folyamat (τ_{offset} = 10461 ± 588 ms), mint a fluoxetin (30 μM) esetén (τ_{offset} = 3437 ± 1016 ms) (35A-B. ábra). Ha a desipramint Mg²⁺ jelenlétében adtuk az időállandó nem különbözött attól, mintha csak Mg²⁺-ot adtunk volna (τ₃ = 507 ± 17 ms), mutatva hogy a desipramin nem volt képes asszociálódni az NMDA receptorhoz ilyen körülmények között (35C. ábra). Ezzel szemben a fluoxetin szignifikánsan megnövelte az időállandót Mg²⁺ jelenlétében (τ_{offset} = 1111 ± 251 ms), noha ez az érték nem érte el a fluoxetin esetében tapasztalt magasabb értéket (35D. ábra). Ezek az adatok alátámasztják a Woodhull-modell alapján levont következtetést, azaz, hogy a desipramin a csatornába kötődik és Mg²⁺

jelenlétében nem képes az asszociációra, míg a fluoxetin kötőhelye felületesebben helyezkedik el, így Mg^{2+} jelenlétében is képes az asszociációra, noha a Mg^{2+} bizonyos mértékben akadályozza ezt a kapcsolódást.

5.3.4. Az eredmények értelmezése: NMDA receptorok szerepe a depresszió kórélettanában

Az antidepresszánsok NMDA antagonista tulajdonsága. Vizsgálatsorozatunk fő kérdése az volt, vajon az SSRI fluoxetin rendelkezik-e NMDA antagonista tulajdonsággal. A desipramint referencia vegyületként használtuk, mivel korábban már leírták, hogy open-channel mechanizmussal gátolja az NMDA receptorokat a 20-50 μM -os koncentráció-tartományban (Sernagor és mtsai, 1989), és számos további tanulmány igazolta ezt a hatást (White és mtsai, 1990; Cai és mtsai, 1992; Mjellem és mtsai, 1993; Watanabe és mtsai, 1993). Mi azt találtuk, hogy a fluoxetin az alacsony mikromólos koncentráció-tartományban, a desipraminhoz hasonló hatékonysággal gátolja az NMDA áramokat kortikális sejtenyészetben. Eredményünknek fontos klinikai vonatkozása lehet. Mint azt már korábban említettük, az antidepresszáns kezelés során a szerek plazmakoncentrációja 1-2 μM körül mozog (Muscettola és mtsai, 1978; Pato és mtsai, 1991), de ennél magasabb koncentrációk is kialakulhatnak az agyban. Mágneses rezonancia spektroszkópiás vizsgálatok adatai szerint a depressziós betegek esetében a fluoxetin steady-state agyi koncentrációja $13 \pm 6 \mu M$ volt (Bolo és mtsai, 2000). A desipraminnal kapcsolatban is megfigyeltek hasonló akkumulációt (Besret és mtsai, 1996). Ezek az adatok összevetve saját eredményeinkkel azt mutatják, hogy mind a fluoxetin mind a desipramin képes lehet a központi idegrendszer NMDA receptorainak gátlására az antidepresszáns terápia során. Mivel klinikai megfigyelések szerint az NMDA receptor modulációja jótékony hatású lehet a depressziós betegekben (Berman és mtsai, 2000; Stryjer és mtsai, 2003; Zarate és mtsai, 2006), feltételezhetjük, hogy az NMDA antagonizmus hozzájárulhat az antidepresszánsok terápiás hatásához.

Habár az antidepresszánsok esetleges NMDA receptor altípus szelektivitását nem kívántuk részletesebben vizsgálni ebben a munkában, az NMDA válasz kinetikai elemzése (Cull-Candy és mtsai, 2001) illetve az NR2B szelektív antagonista ifenprodilra (Williams, 1993) való érzékenysége azt mutatja, hogy preparátumunkban elsődlegesen az NR2B alegység tartalmú NMDA receptorok közvetítik a választ. A tény, hogy a fluoxetin és desipramin hatékonyan gátolják ezeket a receptorokat, erősíti azt az elképzelést, hogy az NMDA antagonizmusnak szerepe lehet az antidepresszáns hatás kialakulásában. A depresszió egy újszerű megközelítése, a network hipotézis szerint ugyanis a különböző károsító

körülmények (pl. a stressz következtében csökkenő neurotrófikus hatások) csökkentik a neuronok, illetve az általuk létrehozott szinaptikus kapcsolatok számát és így okozzák a depresszió kifejlődését. Ugyanakkor az antidepresszánsok épp e folyamatokat fordítják vissza a szinaptikus plaszticitás, illetve a sejtvédő tényezők serkentése révén (Manji és mtsai, 2003; Castren és mtsai, 2007). Kimutatták, hogy az NR2B alegységet tartalmazó NMDA receptorok elsősorban extraszinaptikusan helyezkednek el, és túlzott ingerlésük apoptotikus sejtpusztulást okozhat (Hardingham és mtsai, 2002; Zhou és Baudry, 2006), míg az NR2A alegységet tartalmazó NMDA receptorok főként a szinapszisokban találhatóak, és fiziológias aktivációjuk plasztikus változásokat és a neurotrófikus sejtvédő faktorok (pl. BDNF) felszaporodását váltja ki (Vanhoutte és Bading, 2003). Éppen ezért az NR2B receptorok antidepresszánsok általi gátlása elősegíti neuronális ideghálózatok újrászerveződését a neurotoxikus tényezők kikapcsolásával (Gogas, 2006). Kísérleti eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az NR2B receptorokat bizonyosan gátolják az antidepresszánsok, az NR2A receptorokkal kapcsolatban viszont nincsenek adataink. Mindenesetre ez a kérdés igen fontos klinikai vonatkozásokat rejt magában, így munkacsoportunk tovább folytatja az ezirányú vizsgálatokat.

A fluoxetin és desipramin eltérő kötőhelyei az NMDA receptoron. A lassú perfúziós protokollal végzett kísérletekben megfigyeltük, hogy míg a desipramin gátló hatása folyamatosan emelkedett a perfúzió előrehaladtával, addig a fluoxetin gátlóképessége időben állandónak bizonyult (33C. ábra). A jelenség elemzése érdekében a továbbiakban egy gyors anyagadást lehetővé tevő rendszert használtunk, ami lehetővé tette a válaszok kinetikai jellemzőinek meghatározását. Ezekben a kísérletekben a desipramin feszültségfüggő módon gátolta az NMDA-áramokat, a gátlás csökkent a depolarizáció növekedésével. Ezzel szemben a fluoxetin hatása független volt a tartófeszültségtől. Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a desipramin gátlóképessége függ az idegsejtek aktivitási mintázatától, és csökken, ha a sejtek depolarizálódnak, míg a fluoxetin hatása független a sejtek működési állapotától.

A Woodhull-modell szerint (Woodhull, 1973) egy antagonista gátlási erősségének feszültségfüggése lehetővé teszi a kötőhely elhelyezkedésének meghatározását a sejt transzmembrán elektromos mezejében. A Woodhull-egyenlet segítségével kiszámítható az ún. elektromos távolság (δ), ami egy 0 és 1 között mozgó arányszám és szemléletesen azt fejezi ki, hogy az antagonista a kötőhelyén mekkora hányadát érzékeli a membránpotenciálnak. Az 1 azt jelenti, hogy a teljes elektromos mezőn áthalad, tehát a csatorna intracelluláris oldalán helyezkedik el, a 0 pedig egy extracelluláris oldalon található

kötőhelyet jellemez. Ennek megfelelően a desipraminra kiszámított 0.44-es érték egy, a pórusban mélyen elhelyezkedő kötőhelyre utal, míg a fluoxetin 0.01-es értéke világosan mutatja, hogy az anyag az extracelluláris felülethez igen közel kötődik. Ezzel összhangban áll, hogy a desipramin disszociációs időállandója a depolarizációval párhuzamosan csökken, míg a fluoxetiné nem függ a tartófeszültségtől.

Az eltérő kötőhelyek mellett szól a két anyag Mg^{2+} jelenlétében megfigyelhető viselkedésének különbsége. A desipramin nem változtatta meg a Mg^{2+} általi gátlásból való visszatérés időállandóját, ami arra utal, hogy Mg^{2+} jelenlétében a desipramin nem volt képes bekötődni az NMDA receptor csatornájába. Tekintettel a mélyen elhelyezkedő kötőhelyre és a Mg^{2+} csatornablokkoló képességére ez érthető is. Ezzel szemben a fluoxetin jelentősen megnövelte a Mg^{2+} általi gátlásból való visszatérés időállandóját, tehát még Mg^{2+} jelenlétében is képes volt részleges asszociációra. Mindazonáltal a Mg^{2+} megnehezítette a fluoxetin bekötődését, ami arra utal, hogy a fluoxetin ugyan felületesen kötődik, de valószínűleg az NMDA receptor ioncsatornájának szájadéka közelében. Tehát adataink alapján egyértelmű, hogy noha mindkét antidepresszáns képes az NMDA receptor gátlására, hatásmechanizmusuk, illetve az NMDA receptoron található kötőhelyük különböző.

Az NMDA receptorok lehetséges szerepe a depresszió kórélettanában. Mind több adat mutat arra, hogy a glutamáterg ingerület-átvitel és azon belül is az NMDA receptorok jelentős szerepet játszanak a depresszió kórélettanában (Paul és mtsai, 1994; Palucha és Pilch, 2005). A kompetitív és non-kompetitív NMDA antagonisták számos viselkedési kísérletben antidepresszáns hatásúnak bizonyultak (Trullas és Skolnick, 1990; Maj és mtsai, 1992; Panconi és mtsai, 1993; Papp és Moryl, 1994; Layer és mtsai, 1995; Redmond és mtsai, 1997). A non-kompetitív NMDA antagonistá amantadin vagy memantin együtt adása a fluoxetinnel, venlafaxinnal vagy imipraminnal szinergisztikusan fokozta az antidepresszáns hatást patkány viselkedési tesztekben (Rogoz és mtsai, 2002). Előzetes klinikai vizsgálatokban az amantadin javította a depresszió tüneteit korábbi gyógyszeres kezelésre rezisztens betegekben (Stryer és mtsai, 2003). Placebó kontroll mellett végzett kettős vak klinikai vizsgálatokban az NMDA antagonistá ketamin infúziója 72 órán belül jelentős javulást eredményezett a major depresszióban szenvedő betegeken, és a jótékony hatás legalább még egy hétig megfigyelhető volt (Berman és mtsai, 2000; Zarate és mtsai, 2006). Mindezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az NMDA receptorok működése kapcsolódik a depresszió neurokémiai történéseihez.

A fenti elképzelést megerősítik azok a megfigyelések, amelyek arra utalnak, hogy az NMDA receptorok szerepet játszhatnak az antidepresszánsok hatásmechanizmusában is.

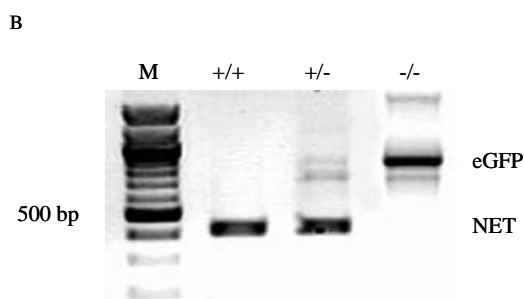
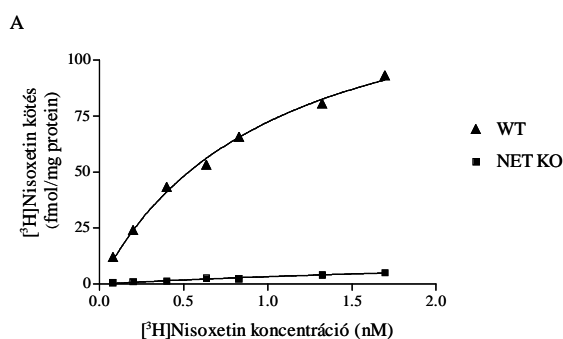
Számos biokémiai (Nowak és mtsai, 1993; Paul és mtsai, 1994), elektrofiziológiai (Bobula és mtsai, 2003) illetve viselkedési (Popik és mtsai, 2000) tanulmány igazolta, hogy az NMDA receptorok funkciója csökken krónikus antidepresszáns kezelés során. Többféle lehetséges elképzelés merült fel az antidepresszáns kezelés és az NMDA receptorok működésének kapcsolatára, azonban a szerzők döntő többsége indirekt mechanizmust javasolt, mint pl. a glutamát felszabadulás csökkentése különböző szinaptikus és nem-szinaptikus hatásokon keresztül (Scanziani és mtsai, 1993; Schmitz és mtsai, 1998; Boehm, 1999; Michael-Titus és mtsai, 2000), a Zn^{2+} koncentráció módosítása különböző kulcsfontosságú agyterületeken (Singewald és mtsai, 2001), vagy a BDNF expresszió szabályozása (Nibuya és mtsai, 1995; Chen és mtsai, 2001). Direkt hatás az NMDA receptoron csak a triciklikus antidepresszánsokkal kapcsolatban merült fel (Sernagor és mtsai, 1989; Cai és mtsai, 1992; Watanabe és mtsai, 1993). Saját kísérleti adataink, miszerint a sokkal kevesebb mellékhatással rendelkező SSRI vegyületek egyik képviselője, a fluoxetin képes az NMDA receptorok gátlására a klinikailag releváns (tehát az antidepresszáns kezelés során előforduló) koncentrációban, megerősíti azt az elképzelést, hogy az NMDA receptor működésének befolyásolása fontos lehet az antidepresszáns hatás kifejlődésében.

5.4. A monoamin transzporterek működésének vizsgálata genetikailag módosított, noradrenalin transzporter hiányos (NET KO) egereken: a heterológ visszavétel jelensége

Mint az irodalmi áttekintésben is láthattuk, a monoamin transzporterek kulcsszerepet játszanak az extracelluláris monoamin szintek, és ezen keresztül a monoaminok által közvetített nem-szinaptikus ingerület-átvitel szabályozásában. A NA transzportert (NET) nem expresszáló egereken folytatott kísérletsorozat eredeti célja az volt, hogy pontosabb képet kaphassunk a NET szerepéről a noradrenerg ingerület-átvitelben, azonban az eredmények a különböző monoaminerg rendszerek közötti, transzporterek által közvetített interakció egy érdekes formájára derítettek fényt.

5.4.1. A genetikai módosítás (NET hiány) igazolása: [³H]nisoxetin kötés és PCR vizsgálat

[³H]Nisoxetin kötés. Kísérleteinkben a kérgi és hippocampális noradrenerg rendszer funkcionális sajátosságait hasonlítottuk össze NET transzporter hiányos (NET KO) és vad



típusú (WT) egerekben. A NET fizikális jelenlétének ellenőrzése céljából a nagy szelektivitású NET ligand, [³H]nisoxetin kötődését vizsgáltuk a két állatcsoportban. A membránokat azon állatok agykérgéből preparáltuk ki, melyeket a transzmitter visszavételi és felszabadulási kísérletekben használtunk. A WT egerekben a specifikus [³H]nisoxetin kötődés a kortikális membránokhoz telíthető volt a ligand koncentráció emelésével. A B_{max} érték 156.1 ± 6.7 fmol/mg protein volt a K_d érték 1.01 ± 0.05 nM. Ezzel szemben a NET KO egerekben a specifikus [³H]nisoxetin

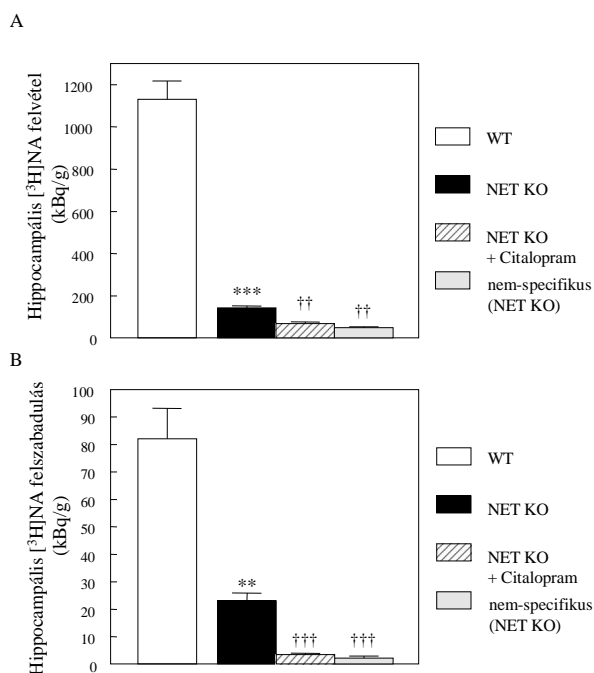
37. ábra. A NET hiányának igazolása genetikailag módosított egerekben. A: A specifikus [³H]nisoxetin kötés telítési görbéje WT és NET KO egerekben. A kérgi P2 szinaptoszóma preparátum az uptake és release kísérletekben használt állatokból származott. B: WT (+/+), heterozigóta (+/-) és homozigóta NET KO (-/-) egerekből származó DNS minta PCR elemzése. A NET-specifikus sáv egy 470 bázis pár hosszúságú terméként jelentkezett, míg a jelölő szerepet betöltő eGFP génre specifikus primerek egy 700 bázispár nagyságú töredéket azonosítottak (M = molekuláris méret minta).

kötődés gyakorlatilag a nullához közelített, igazolva a NET hiányát (37A. ábra).

PCR vizsgálatok. A NET genetikai jelenlétét PCR vizsgálatokban is ellenőriztük. A vad típusú egerekben egy 470 bázispár nagyságú, NET gént reprezentáló szakasz volt észlelhető. A heterozigóta állatokban egy további 700 bázispár nagyságú szakasz is kimutatható volt az eGFP gén teljes kódoló régióját felismerő primerekkel. Ez utóbbi gén a heterológ rekombináció során került a genetikai állományba jelölésként (Xu és mtsai, 2000). A NET KO állatokban csak az eGFP gént sikerült kimutatni, míg a NET-nek megfelelő szakasz hiányzott (37B. ábra).

5.4.2. A noradrenerg rendszer funkcionális jellemzése: [³H]NA felvétel és felszabadulás vizsgálata

[³H]NA felvétel. A WT egerekből származó hippocampus szeletekben a [³H]NA



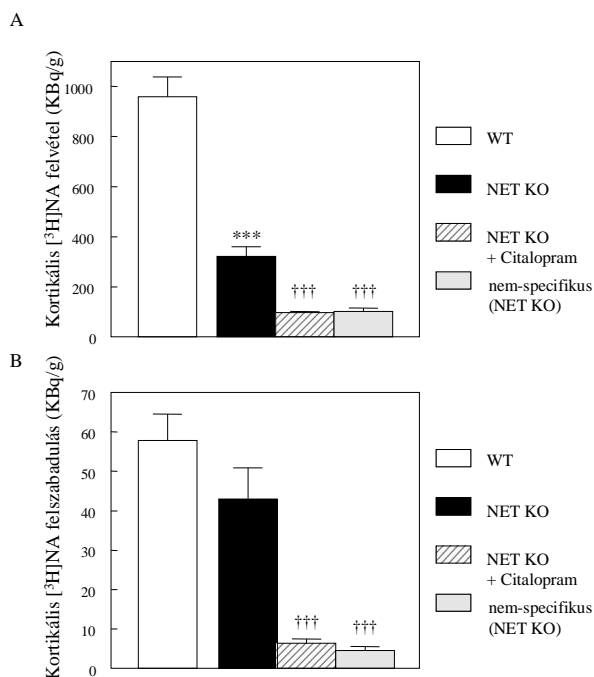
38. ábra. A hippocampus noradrenerg rendszerének funkcionális jellemzése. Mind a [³H]NA felvételt (A), mind a [³H]NA felszabadulást (B) WT és NET KO állatokból származó hippocampus szeleteken mértük. Mikor a citalopramot vagy a nisoxtin, GBR-12909 és citalopram kombinációját használtuk, mindegyik gátlószer 1 µM-ban volt jelen a töltési fázistól kezdődően. Az adatok 4-6 kísérlet átlagát és standard hibáját képviselik. A WT és a NET KO kontroll csoport adatait kétutas t-próbával elemeztük (** p < 0.01; *** p < 0.001), míg a NET KO csoportokat ANOVA-t követő Tukey-Kramer teszt segítségével hasonlítottuk össze (†† p < 0.01, ††† p < 0.001 a NET KO kontrollhoz képest).

felvétel 1130 ± 87 kBq/g nedves szövet volt. Noha a NET KO állatokban a felvétel szignifikánsan csökkent, még mindig kimutatható volt (142 ± 10 kBq/g nedves szövet, a WT kontroll 12.6 %-a, p < 0.001, kétutas t-próba, a továbbiakban is ezt a módszert használtuk a WT és NET KO állatok összehasonlítására). E megmaradó felvétel döntő többsége neuronális eredetű volt, mivel a szelektív monoamin visszavétel gátlókból álló keverék (nisoxtin, citalopram, GBR-12909, mindegyik 1 µM) jelenlétében, azaz a NA, 5-HT és DA transzporterek teljes gátlása esetén a visszavétel 50 ± 3 kBq/g nedves szövet értékre csökkent (ez az érték felelt meg a nem specifikus felvételnek, a NET KO felvétel 35.2 %-a, p < 0.01, ANOVA-t követő Tukey-Kramer többszörös összehasonlítási teszt, a továbbiakban is ezt a statisztikai

elemzést használtuk a NET KO csoportokon belüli összehasonlításokra). Az SSRI citalopram

(1 μ M) önmagában hasonló mértékű csökkenést okozott (69 ± 8 , kBq/g nedves szövet, a NET KO kontroll 48.5 %-a, $p < 0.01$; viszont nem különbözik szignifikánsan a nem specifikus felvételtől) (38A. ábra). Ha ebből az értékből kivonjuk a nem specifikus felvételt, akkor azt kapjuk, hogy a citalopram a reziduális neuronális visszavétel 79.4 %-át gátolta.

A WT egerekből származó frontális kéreg szeletekben a [3 H]NA felvétel 958 ± 80



39. ábra. A frontális kéreg noradrenerg rendszerének funkcionális jellemzése. Mind a [3 H]NA felvételt (A), mind a [3 H]NA felszabadulást (B) WT és NET KO állatokból származó frontális kéreg szeleteken mértük. További részletekért ld. a 38. ábra magyarázatát.

szignifikánsan a citalopramos csoporttól), mint a citalopram önmagában (39A. ábra). Így a reziduális neuronális [3 H]NA felvétel teljes egészében eltűnt a citalopram jelenlétében.

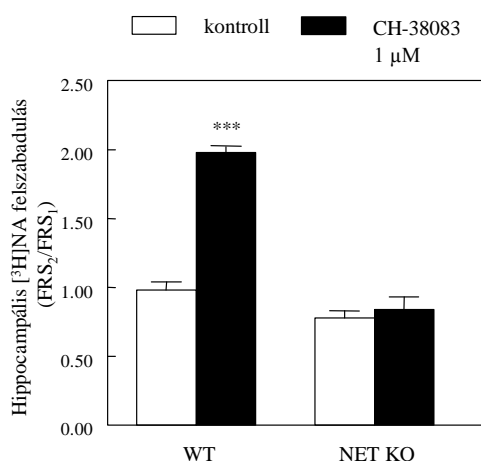
[3 H]NA felszabadulás. A felvétel mellett a felszabadulás az a fontos tényező, ami jelentősen befolyásolhatja a monoaminok extracelluláris koncentrációját. Ezen funkció vizsgálata céljából mértük az elektromos ingerlés-kiváltotta [3 H]NA felszabadulást hippocampus és kéreg szeletekből. A hippocampusban az elektromos ingerlés-kiváltotta felszabadulás 82.05 ± 11.1 kBq/g nedves szövet volt a WT állatokban. Ez az érték szignifikánsan csökkent a NET KO egerekben (23.05 ± 2.86 kBq/g nedves szövet, a WT kontroll 28.1 %-a, $p < 0.01$). A citalopram (1 μ M) jelenléte szinte teljesen megszüntette a felszabadulást a NET KO állatokban (3.43 ± 0.52 kBq/g nedves szövet, a NET KO kontroll 14.9 %-a, $p < 0.001$) (38B. ábra). Egy igen kismértékű felszabadulás még a citalopram, nisoxtin és GBR-12909 együttes jelenléte esetén is megfigyelhető volt (2.19 ± 0.73 kBq/g

kBq/g nedves szövet volt. Ez a felvétel csak egyharmadára csökkent a NET KO állatokban (321 ± 38 kBq/g nedves szövet, a WT kontroll 33.5 %-a, $p < 0.001$). A citalopram önmagában igen jelentős további csökkenést okozott (97 ± 4 kBq/g nedves szövet, a NET KO kontroll 30.2 %-a, $p < 0.001$). A NA felvétel citalopram inszenzitív része (reziduális felvétel) nem a monoamin transzporterek működésének következménye volt, hiszen a citalopram, nisoxtin és GBR-12909 (mindegyik 1 μ M) keveréke ugyanolyan mértékű gátlást okozott (nem specifikus felvétel, 102 ± 14

kBq/g nedves szövet, a NET KO kontroll 31.8 %-a, $p < 0.001$ a NET KO kontrollhoz viszonyítva), de nem különbözik

nedves szövet, a NET KO kontroll 9.5 %-a of, $p < 0.001$, nem specifikus felszabadulás). Mivel ebben az esetben a neuronális felvétel teljes gátlás alatt állt, ez a reziduális felszabadulás specifikus folyamatok eredményeként jöhetett létre (pl. $[^3\text{H}]\text{NA}$ membránon keresztüli diffúziója révén). A specifikus felszabadulás (összes - nem specifikus) szinte teljesen eltűnt a NET KO csoportban a citalopram jelenlétében (94.1 % csökkenés a NET KO kontrollhoz képest).

A frontális kéregben az elektromos ingerlés-kiváltotta felszabadulás 57.82 ± 6.76 kBq/g



40. ábra. Az *in vitro* $[^3\text{H}]\text{NA}$ felszabadulás preszinaptikus modulációja egér hippocampus szeletekben. Az elektromos ingerlés-kiváltotta válasz az α_2 -adrenoceptor antagonistá CH-38083 (1 μM) hiányában (FRS1) és jelenlétében (FRS2) került összehasonlításra (FRS2/FRS1 arány) WT és NET KO állatokban. Az adatok 4 kísérlet átlagát és standard hibáját képviselik. A statisztikai elemzéshez ANOVA-t követő Tukey-Kramer tesztet használtunk (***) $p < 0.001$ a WT kontrollhoz képest)

nedves szövet volt a WT állatokban. Érdekes módon a neuronális $[^3\text{H}]\text{NA}$ felszabadulás nem csökkent szignifikánsan a NET KO egerekben (43.02 ± 7.87 kBq/g nedves szövet, a WT kontroll 74.4 %-a, $p > 0.05$). Ugyanakkor citalopram (1 μM) jelenlétében a csökkenés drámai volt (6.36 ± 1.09 kBq/g nedves szövet, a NET KO kontroll 14.8 %-a, $p < 0.001$). Az uptake gátló keverék jelenlétében mérhető aspecifikus felszabadulás 4.57 ± 0.97 kBq/g nedves szövet volt (a NET KO kontroll 10.6 %-a, $p < 0.001$) (39B. ábra). A specifikus felszabadulás, hasonlóan a hippocampushoz, szinte teljesen eltűnt a citalopram jelenlétében (95.3 % csökkenés a NET KO kontrollhoz képest).

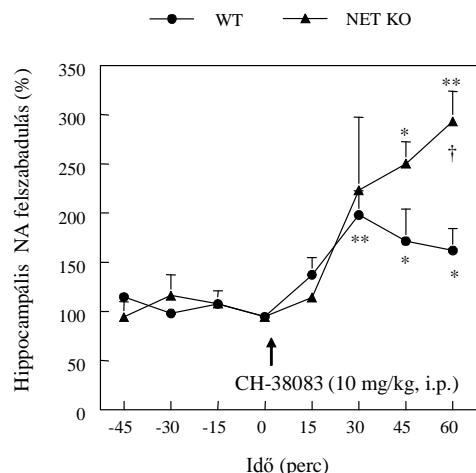
5.4.3. A NA felszabadulás preszinaptikus modulációjának vizsgálata *in vitro* és *in vivo*: elektromos ingerlés-kiváltotta $[^3\text{H}]\text{NA}$ felszabadulás és mikrodialízis kísérletek

A varikozitásokból történő NA felszabadulást preszinaptikusan elhelyezkedő, gátló hatású α_2 -adrenoceptorok szabályozzák. Ezt a szabályozó mechanizmust vizsgáltuk a szelektív α_2 -antagonista CH-38083 segítségével (Vizi és mtsai, 1986).

Elektromos ingerlés-kiváltotta $[^3\text{H}]\text{NA}$ felszabadulás. A kontroll kísérletekben az FRS2/FRS1 arány egyhez közeli érték volt (0.98 ± 0.06 , $n = 4$). A NET KO csoportban ez az érték valamivel alacsonyabb volt (0.78 ± 0.05 , $n = 4$), de a különbség nem volt szignifikáns. A CH-38083 alkalmazásakor (1 μM , a második ingerlés előtt adva) a NA felszabadulás

szignifikánsan megnőtt a WT állatokban (1.98 ± 0.04 , $n = 4$, $p < 0.01$, a WT kontrollhoz képest), de nem változott a NET KO csoportban (0.84 ± 0.09 , $n = 4$) (40. ábra).

Mikrodialízis kísérletek. A nyugalmi NA felszabadulás szignifikánsan magasabb volt a NET KO állatok hipocampusában (4.13 ± 0.65 pg/20 μ l minta, $n = 6$, $p < 0.05$, kétirányú t-



41. ábra. Az endogén NA felszabadulás preszinaptikus modulációja altatót egérben. A mikrodialízis mintavevőt a ventrális hipocampusba ültettük, és az alapvonal stabilizálódása után 4 nyugalmi frakciót gyűjtöttünk, majd az állatok CH-38083-at kaptak (10 mg/kg, i.p.) a 0 időpontban (nyíl) és 4 további frakciót gyűjtöttünk. Az adatok 4-6 kísérlet átlagát és standard hibáját képviselik. A statisztikai elemzéshez két utas ANOVA-t ismételt mérésekkel majd Dunnett tesztet (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, a megfelelő bazális értékhez hasonlítva) illetve Tukey tesztet († $p < 0.05$, a NET KO és WT csoportok időpontként összevetéséhez) használtunk. Az adatok 4-6 kísérlet átlagát és standard hibáját képviselik. A statisztikai elemzéshez két utas ANOVA-t ismételt mérésekkel majd Dunnett tesztet (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, a megfelelő bazális értékhez hasonlítva) illetve Tukey tesztet († $p < 0.05$, a NET KO és WT csoportok időpontként összevetéséhez) használtunk.

emelkedés megháromszorozódott (62 % vs. 193 % emelkedés, $p < 0.05$, kétutas ANOVA ismételt mérésekkel, majd Tukey test) a NET KO egerekben.

próba) mint a WT csoportban (1.84 ± 0.20 pg/20 μ l minta, $n = 4$). A nyugalmi felszabadulás idegi eredetű volt, hiszen független kísérletekben a Na^+ -csatorna gátló TTX infúziója (1 μ M a mintavevőn keresztül) 65 %-kal csökkentette a NA koncentrációt a WT csoportban és 85 %-kal a NET KO csoportban 90 perccel az adagolás megkezdése után (nincs ábrázolva). Az α_2 -adrenoceptor antagonist CH-38083 (10 mg/kg, i.p.) szignifikánsan növelte a hipocampális NA koncentrációt mindkét csoportban (41. ábra), de a hatás lényegesen erősebb volt a NET KO állatokban. A normalizált adatok elemzése kimutatta, hogy a felszabadulás nyugalmi szinthez képesti növekedése megduplázódott (görbe alatti terület számítás: 481.44 ± 81.66 vs. 258.44 ± 53.93 , önkényes egységekben, $p < 0.05$, párosítatlan kétirányú t-próba), illetve a 60 perc után mérhető

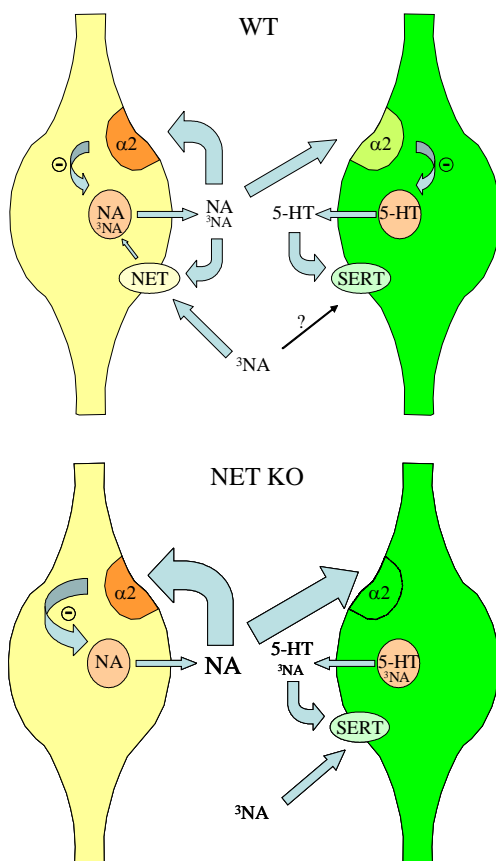
5.4.4. Az eredmények értelmezése: a heterológ visszavétel jelensége

A kísérletek célja az volt, hogy megvizsgáljuk, hogyan változik a monoaminerg transzmisszió, ha az extracelluláris monoamin szintek alakulását döntően befolyásoló monoamin transzporterek nincsenek jelen az idegrendszerben. Vizsgálatainkhoz a NET KO egereket használtuk, melyeknél a genetikai módosítás következtében a NA neuronális membrántranszportere hiányzik (Wang és mtsai, 1999; Xu és mtsai, 2000). Az első fázisban különböző neurokémiai és molekuláris biológiai módszerekkel ellenőrizni kívántuk, hogy az általunk használt állatok valóban NET hiányosak. A nisoxetin a neuronális NA felvétel egyik

legszelektívebb gátlószere, mely nagy affinitással kötődik a NA transzporterhez, így alkalmas a transzporter jelenlétének kimutatására receptorkötési kísérletekben (Tejani-Butt és mtsai, 1990). A specifikus [^3H]nisoxetin kötődés teljes hiánya a NET KO egerekben világosan mutatta, hogy az általunk használt állatok valóban nem fejezik ki a NA transzportert. Az RT-PCR vizsgálatok azt is igazolták, hogy a NET fizikális hiánya a genetikai állományban bekövetkezett módosítás következménye. Ezután funkcionális transzmitter felszabadulási kísérletekben is igazolni kívántuk a transzporter hiányát. Mivel a tríciummal jelölt NA-nal folytatott kísérletekben a mérhető transzmitter felszabadulás alapfeltétele, hogy a [^3H]NA a töltési periódusban bekerüljön az idegsejtekbe a neuronális NA transzporter működése révén, azt vártuk, hogy a NET KO egerekben sem szöveti felvételt, sem elektromos ingerléskiváltotta felszabadulást nem fogunk látni. Meglepő volt tehát az az eredményünk, miszerint a NET KO állatokban csökkent ugyan a [^3H]NA felvétel és felszabadulás, de nem tűnt el. Két agyterületet vizsgáltunk, melyeknek monoaminerg beidegzése nem teljesen azonos. A hippocampus főként noradrenerg és szerotonerg beidegzést kap (Mongeau és mtsai, 1997; Vizi és Kiss, 1998), míg a frontális kéregben az előbb említetteken kívül jelentősebb mennyiségű dopaminerg beidegzés is található (Descarries és mtsai, 1987; Doucet és mtsai, 1988). Legfontosabb eredményünk az volt, hogy a NET hiányos állatokban a szöveti [^3H]NA felvétel agyterülettől függő módon változó része megmaradt, sőt a felszabadulási kísérletek azt is bizonyították, hogy a [^3H]NA az idegsejtekbe került be. A nagy szelektivitású 5-HT felvételt gátló citalopram használatával sikerült bizonyítanunk azt is, hogy a [^3H]NA felvétele a szerotonin transzporterén (SERT) keresztül zajlik. Az SSRI vegyületek közül a citalopram rendelkezik a legnagyobb szelektivitással, A K_i értéke a 5-HT felvételre nézve 14 nM, míg a NA-ra 32 μM , a DA-ra pedig 41 μM (Hyttel, 1977). Mivel kísérleteinkben 1 μM -ban alkalmaztuk, ebben a koncentrációban csak a 5-HT felvételt gátolta, de nem befolyásolta érdemlegesen sem a NET sem a DAT aktivitását. A hippocampusnak dús noradrenerg és szerotonerg beidegzése van, viszont a dopaminerg varikozitások igen ritkák, a 5-HT:NA:DA varikozitás arány 30:25:1 (Feuerstein és mtsai, 1986). A szerotonerg varikozitások átlag sűrűsége 2.7 millió/ mm^3 (Oleskevich és Descarries, 1990), míg a noradrenergé 2.1 millió/ mm^3 (Oleskevich és mtsai, 1989). Mivel a genetikai módosítás miatt a hippocampusban gyakorlatilag csak a SERT van jelen (elhanyagolható mennyiségű DAT mellett), ez tovább erősíti azt a következtetésünket, hogy a [^3H]NA neuronális felvétele csak a szerotonin transzporterén keresztül történhetett. A frontális kéregben ugyanakkor számottevő dopaminerg beidegzés is található, habár mennyiségileg elmarad a noradrenerg és szerotonerg beidegzés mögött. A dopaminerg varikozitások sűrűsége 0.25 millió/ mm^3

(Doucet és mtsai, 1988), a szerotonergké 5.8 millió/mm³, míg a noradrenergké 1.2 millió/mm³ (Audet és mtsai, 1988; 1989). Emellett immunhisztokémiai vizsgálatokban kimutatták, hogy a varikozitás sűrűség és a transzporterek száma nem feltétlenül arányos egymással (Ciliax és mtsai, 1995). A prefrontális kéregben a DAT immunreaktivitást csak a varikozítások közötti idegsejt szakaszokon mutatták ki, míg a varikozításokon nem (Sesack és mtsai, 1998). Ez arra utal, hogy a DAT-ok száma igen alacsony lehet ezen az agyterületen. Funkcionális vizsgálatok is igazolják, hogy a frontális kéregben a DAT minimális szerepet játszik a DA eltávolításában az extracelluláris térből, hiszen a szelektív DA visszavétel gátló GBR-12909 nem képes a DA felvétel gátlására e régióban (Moron és mtsai, 2002). Mivel a NA-nak sokkal kisebb az affinitása a DAT-hoz, mint a DA-nak, igen valószínű, hogy a DAT a frontális kéregben sem játszott szerepet a [³H]NA neuronális felvételében. A mi adataink is megerősítik ezt a feltételezést, hiszen az SSRI citalopram önmagában pontosan olyan mértékben akadályozta meg a [³H]NA akkumulációt a SERT-re szelektív koncentrációban, mint a GBR-12909, nisoxtin és citalopram keveréke. Mindez azt mutatja, hogy a frontális kéregben is teljes egészében a SERT felelős a [³H]NA idegsejtekbe való bekerüléséért. Az adatok kvantitatív elemzése további bizonyítékot szolgáltat a SERT szerepére. A hippocampusban, ahol a 5-HT:NA varikozitás aránya egyhez közeli érték, mindössze a WT egerekben tapasztalt szöveti [³H]NA felvétel 12,6 %-a volt megfigyelhető, ugyanakkor a kéregben, ahol a szerotonerg varikozítások sokkal inkább dominálják a régiót (a 5-HT:NA varikozitás arány több mint 4), egy sokkal magasabb felvételi érték (33.5 %) konzerválódott a NET KO egerekben. A magasabb felvételi értékhez jelentősebb transzmitter felszabadulás párosult, ami aláhúzza a NA szerotonerg terminálisok általi, ú.n. heterológ felvételének jelentőségét, és arra utal, hogy bizonyos körülmények között a szerotonerg neuronok tüzelési aktivitása is befolyásolhatja a NA extracelluláris koncentrációját.

Következtetéseinket a NA preszinaptikus modulációjának vizsgálata is alátámasztotta. A hippocampusban a NA felszabadulást a noradrenerg varikozításokon elhelyezkedő, negatív visszacsatolást közvetítő α_2 -adrenoceptorok szabályozzák (Vizi, 1979; Starke, 1981; Milusheva és mtsai, 1994; Kiss és mtsai, 1995). Habár preszinaptikus α_2 -adrenoceptorok a szerotonerg terminálisokon is vannak (Maura és mtsai, 1982; Zhang és mtsai, 1995; De Boer és mtsai, 1996; Scheibner és mtsai, 2001), kimutatták, hogy a két α_2 -adrenoceptor populáció farmakológiailag különbözik (Frankhuyzen és Mulder, 1982; Mongeau és mtsai, 1993). Ez a különbség magyarázhatja, hogy a 5-HT felszabadulást szabályozó α_2 -adrenoceptorok



42. ábra. A preszinaptikus regulációval kapcsolatos adatok értelmezése. A vad típusú (WT) egérben a [^3H]NA a noradrenerg varikozitásokban halmozódik fel, ezért az α_2 -antagonista CH-38083 (nincs feltüntetve) mind az *in vitro* mind az *in vivo* felszabadulást modulálja. A NET KO állatokban a szerotonerg terminálisokon található α_2 -adrenoceptorok deszenzitizálódnak a magasabb NA szint miatt, míg a noradrenerg varikozitásokon lévő autoreceptorok megőrzik aktivitásukat. Mivel ebben az esetben a [^3H]NA a szerotonerg varikozitásokban halmozódik fel, az *in vitro* [^3H]NA felszabadulás nem lesz modulálható, míg a mikrodialízissel mért endogén NA felszabadulás igen. ($^3\text{NA} = [^3\text{H}]\text{NA}$)

található α_2 -adrenoceptorok nem deszenzitizálódtak és a megnövekedett extracelluláris NA szint miatt erősebb gátló hatást gyakoroltak a NA felszabadulásra (42. ábra).

Egyre több adat mutatja, hogy heterológ visszavétel valóban létezik a DAT, NET és SERT esetében. A szelektív monoamin visszavétel gátlókat és specifikus pálya roncsolásokat használó munkák bizonyították, hogy a noradrenerg és szerotonerg neuronok képesek a [^3H]DA felvételére (Descarries és mtsai, 1987). Később mikrodialízis kísérletekkel igazolták,

deszenzitizálódnak krónikus antidepresszáns (desipramin, nisoxetin) kezelés (tehát a NA szint tartós megemelkedése) során (Blier és Bouchard, 1994; Mongeau és mtsai, 1994; Yoshioka és mtsai, 1995), míg a noradrenerg varikozitásokon elhelyezkedő autoreceptorok megőrzik aktivitásukat (Schoffelmeer és Mulder, 1982; Campbell és McKernan, 1986; Mongeau és mtsai, 1997). A mikrodialízis kísérletekben jelentősen emelkedett NA szinteket találtunk a NET KO egerekben, tehát a neurokémiai körülmények igen hasonlóak a krónikus antidepresszáns kezelés során tapasztaltakhoz. Mindezek alapján valószínű, hogy a szerotonerg terminálisokon elhelyezkedő α_2 -adrenoceptorok deszenzitizálódtak. Kísérleteinkben az elektromos ingerlés-kiváltotta [^3H]NA felszabadulást nem modulálta az α_2 -adrenoceptor antagonistá CH-38083, viszont az *in vivo* mikrodialízissel mért NA felszabadulást igen. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a [^3H]NA valószínűleg a szerotonerg varikozitásokból származik, melyek fel tudták halmozni a jelölt transzmittert a SERT-en keresztül, míg az endogén NA felszabadulás forrása a noradrenerg rendszer, hiszen ebben az esetben még fokozódott is a CH-38083 hatékonysága a NET KO egerekben. Ez a megnövekedett hatékonyság azzal magyarázható, hogy a noradrenerg varikozitásokon

hogya a NET jelentősen befolyásolja a dopaminerg ingerület-átvitelt, hiszen a NET gátlószerei növelték az extracelluláris DA szintet a prefrontális kéregben (Carboni és mtsai, 1990; Yamamoto és Novotney, 1998). Voltametriás vizsgálatok pedig azt mutatták, hogy a NET gátlók lecsökkentették a DA clearance-ét az extracelluláris térből (Mundorf és mtsai, 2001). Ezzel összhangban egyes kutatók azt feltételezték, hogy a DA NET általi felvétele szerepet játszik a kokain önadagolás kialakulásában DAT hiányos egerekben (Carboni és mtsai, 2001). A dopaminerg és szerotonerg felvétel közötti kapcsolatot szintén leírták már. Kimutatták, hogy a dopaminerg terminálisok képesek a [³H]5-HT felvételére és felszabadítására nyúl hippocampusában (Feuerstein és mtsai, 1986). Megfigyelték, hogy a kokainhoz való hozzászokás kialakítható DAT vagy SERT hiányos állatokban, viszont megszűnik a kombinált DAT/SERT KO egerekben, tehát mindkét uptake rendszer szerepet játszik a kokain jutalmazási mechanizmusában (Sora és mtsai, 2001). Összegezve, a NET/DAT illetve DAT/SERT heterológ felvétel már jól dokumentált az irodalomban, azonban a NET és SERT közötti kapcsolat, és kifejezetten a NA SERT általi heterológ felvétele és a NA felszabadulása a szerotonerg terminálisokból egy teljesen új megfigyelés. A transzmitter felszabadulási kísérleteink azt mutatják, hogy e heterológ felvételnek komoly funkcionális következményei lehetnek, hiszen a frontális kéregből felszabaduló [³H]NA mennyisége nem volt lényegesen kisebb a NET KO egerekben, tehát a szerotonerg rendszer jelentős mértékben hozzájárult a noradrenerg neurotranszmisszióhoz a NET hiányos állatokban. De vajon van-e relevanciája eredményeinknek a normál állatokban és az emberben? Nyilvánvaló különbség a funkcionális nagy affinitású NET jelenléte a noradrenerg varikozitásokon. Ráadásul az extracelluláris NA szint sokkal alacsonyabb mint a NET KO állatokban. Ezek a körülmények csökkentik annak esélyét, hogy a SERT-en keresztül a szerotonerg rendszer érdemben hozzájáruljon a noradrenerg ingerület-átvitelhez. Mindazonáltal, a transzporter sűrűségekkel kapcsolatban még nem rendelkezünk átfogó és részletes adatokkal, így könnyen lehet, hogy vannak olyan agyterületek, melyek mind noradrenerg, mind szerotonerg beidegztetést kapnak, viszont a NET mennyisége igen alacsony, hasonlóan a prefrontális kéregben megfigyelt elenyésző számú DAT-hoz (Ciliax és mtsai, 1995; Sesack és mtsai, 1998). Az ilyen területeken a SERT szerepe igen fontos lehet. Ezen kívül a szerotonerg terminálisok azon tulajdonsága, hogy bizonyos körülmények között képesek lehetnek a NA felvételére, majd akciós potenciálok hatására a NA felszabadítására, előtérbe kerülhet olyankor is, mikor a NA transzporterek működése valamilyen endogén vagy exogén ok (pl. gyógyszeres kezelés) következtében akadályoztatott.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A disszertációban ismertetett kutatások központi témája a monoamin transzporterek működési sajátosságainak vizsgálata volt. A monoamin transzporterek az extracelluláris monoamin szintek szabályozásának fontos tényezői, és kiemelt humán farmakológiai jelentőséggel bírnak, mivel a depresszió kezelésére jelenleg használt gyógyszerek elsődleges célpontjai. Érthető módon ezért eredményeinknek részben alapkutatási vonatkozásai vannak, de a legtöbb vizsgált témakörnek szoros kapcsolata van a klinikai gyakorlattal, illetve az antidepresszáns gyógyszerek esetleges fejlesztési irányjaival is. A következő négy fő témakörrel foglalkoztunk:

1. A NO szabályozó szerepe a monoamin transzporterek működésében: a receptorok nélküli nem-szinaptikus kommunikáció elmélete;
2. A nikotin agonisták által kiváltott carrier-mediálta felszabadulás és annak lehetséges jelentősége a depresszió kezelésében: az aktív antidepresszánsok elmélete;
3. A monoamin uptake gátlók nem-konvencionális központi idegrendszeri hatásai: új célpontok azonosítása a depresszió kezelésében;
4. A szerotonin transzporterek heterológ NA felvételi képessége: az SSRI vegyületek hatásmechanizmusával kapcsolatos klinikai vonatkozások.

A harmadik témakör oly módon kapcsolódik a monoamin transzporterekhez, hogy a megfigyelt nem-konvencionális hatások hátterében a transzporterek csatorna-tulajdonságai állnak. Az első kivétellel mindegyik vizsgált témakör szoros kapcsolatban áll a depresszióval, ezért fontos klinikai vonatkozásokkal rendelkezik.

6.1. A NO szabályozó szerepe a monoamin transzporterek működésében: a receptorok nélküli nem-szinaptikus kommunikáció elmélete

Kísérleteinkben a szervezetben termelődő NO hatásait kívántuk tanulmányozni a monoaminerg transzmisszióra, ezért különböző NO szintézis gátlókat alkalmaztunk és figyeltük az okozott változásokat (Kiss, 2000). Megállapítottuk, hogy a specifikus nNOS gátló 7-NI potenciózza a DMPP-kiváltotta NA felszabadulást patkány hippocampus szeletekből, és a hatás egyértelműen a transzporterrel függ össze, mivel a serkentés csak a DMPP válasz carrier-mediálta komponensére (ld. 6.3.) korlátozódik (Kiss és mtsai, 1996). *In*

vivo mikrodialízis kísérletekben azt találtuk, hogy a nem specifikus NOS gátló L-NAME csökkenti a nyugalmi DA felszabadulást patkány striátumában, azonban ez a hatás a DA uptake gátló nomifensin jelenlétében nem figyelhető meg (Kiss és mtsai, 1999). Mindkét kísérletsorozat eredményét magyarázhatjuk azzal, hogy a szervezetben termelődő endogén NO gátolni képes a monoamin transzporterek működését azok aktuális működési irányától függetlenül. A patkány striatum szeleteken folytatott kísérleteink direkt bizonyítékot szolgáltatnak erre a feltételezésünkre, ugyanis a NOS inhibitor L-NAME serkentette, míg a NO donor SNP gátolta a DA felvételét (Kiss és mtsai, 2004).

A NO monoamin transzporterekre gyakorolt gátló hatása egy érdekes kommunikációs lehetőséget teremt a monoaminerg és glutamáterg rendszerek között. Az idegsejtekben található neuronális NOS általi NO szintézis hűen tükrözi a glutamáterg sejtek aktivitását, ugyanis a Ca^{2+} -függő nNOS a PSD-95 fehérjén keresztül szorosan kapcsolódik az NMDA receptorhoz, így az enzim a receptor aktiválódásakor kezd működni. A termelődő NO szabadon diffundál akár száz μm -es távolságra is és gátolja a monoamin transzporterek működését az aktiválódott szinapszis környezetében, így az adott területen megnő a monoaminok extracelluláris koncentrációja. A magasabb monoamin szint viszont preszinaptikus receptorokon keresztül gátolni képes a glutamát további felszabadulását, így egy szabályozó jellegű negatív visszacsatolás valósulhat meg. A glutamát elsődlegesen a szinaptikus ingerület-átvitelben játszik szerepet, de a NO segítségével a fent vázolt módon nem szinaptikus kölcsönhatásokban is részt vehet. Mivel a monoaminerg rendszer a glutamát specifikus receptorainak expressziója nélkül is képes a glutamáterg rendszerből érkezett információ felfogására, a NO transzporterekre gyakorolt hatása a nem-szinaptikus kölcsönhatások egy új formáját teremti meg, a receptorok nélküli nem-szinaptikus kommunikációt (Kiss és Vizi, 2001).

6.2. A nikotin agonisták által kiváltott carrier-mediálta felszabadulás és annak lehetséges jelentősége a depresszió kezelésében: az aktív antidepresszánsok elmélete

A kolinerg rendszernek és ezen belül a nAChR-oknak a kognitív működésekben betöltött szerepe már régóta ismert. Az egyre halmozódó megfigyelések arra utalnak, hogy emellett a noradrenerg rendszernek, illetve a két rendszer kölcsönhatásának is fontos szerepe van különböző tanulási és memória funkciókban. Ezért kezdte el munkacsoportunk vizsgálni a nikotin agonisták noradrenerg rendszerre gyakorolt hatásait és e munka során figyeltünk fel arra a jelenségre, hogy a nikotin agonisták egyike, a DMPP a többitől eltérő módon

viselkedik (Kiss és mtsai, 2001). A DMPP NA felszabadulásra gyakorolt hatásának elemzése volt tehát az elsődleges célunk, melyet *in vitro* szeletkísérletekkel valósítottunk meg. Nikotin antagonisták, α_2 -adenoreceptorokra ható szerek, TTX és Ca^{2+} -mentes közeg felhasználásával megállapítottuk, hogy a DMPP a többi nikotin agonistától eltérően nem csak a nAChR-ok ingerlése révén okoz vezikuláris exocitózissal NA felszabadulást, hanem képes a NET működési irányának megfordításával egy carrier-mediálta NA felszabadulás kiváltására is (Kiss és mtsai, 1997).

Mivel a NET nagyfokú homológiát mutat a DAT-tal és a SERT-tel, a következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy a DMPP kettős hatása megfigyelhető-e a dopaminerg és szerotonerg rendszer esetében is. Hasonló metodikai megközelítéssel megállapítottuk, hogy a DMPP az összes monoamin transzporter működési irányát képes megfordítani, ugyanakkor érdekes módon a nAChR-ok által közvetítette hatása csak bizonyos koncentráció határig figyelhető meg a DA felszabadulással kapcsolatban, és egyáltalán nem észlelhető a szerotonerg rendszer esetén (Szász és mtsai, 2005). Kísérleteink egyik tanulsága az, hogy igen körültekintően kell értelmezni a kísérleti eredményeket olyan esetben, mikor az egyébként gyakran használt DMPP-t alkalmazzák nikotin agonista vegyületeként.

A DMPP-vel kapcsolatban megfigyelt carrier-mediálta transzmitter felszabadulás továbbgondolása vezetett az aktív antidepresszánsok elméletének kidolgozásához (Kiss, 2007). Az elmélet egyik fontos feltevése, hogy a depresszióban érintett monoaminerg rendszerek elsősorban nem-szinaptikus kölcsönhatásokban vesznek részt, ezért a depressziót is valószínűleg a nem-szinaptikus kölcsönhatások zavarára lehet visszavezetni. Éppen ezért olyan kezelési stratégiát kell választanunk, amely hatékonyan javítja ezt a fajta sejtek közötti kommunikációt. A jelenleg használt antidepresszánsok hatásmechanizmusát elemezve arra a következtetésre jutottunk, hogy a tapasztalt viszonylagos hatástalanság (a betegek 30-40 %-a terápia-rezisztens) arra vezethető vissza, hogy e szerek csak akkor tudják kifejteni monoamin szint-emelő hatásukat, ha a monoaminerg idegsejtek elektromos aktivitása megfelelő. Mivel a depresszió éppen ezen aktivitás csökkenésével jár, a jelenleg használt antidepresszánsok hatása csak sokára (3-4 hét) alakul ki, és a betegek jelentős része nem reagál a kezelésre. A carrier-mediálta transzmitter felszabadulás azért kecsegtet jobb eredményekkel, mert ebben az esetben a sejtek aktivitásától függetlenül folyamatosan töltődik az extracelluláris tér monoaminokkal a transzporter megfordult működésének következtében. Mivel a terápiás hatás kialakulása független az idegsejtek működésétől, az antidepresszánsoknak ezen új csoportját aktív antidepresszánsoknak nevezzük. E vegyületek, bizonyos fontos kritériumok

(szelektivitás, hatáserősség) teljesítése esetén hatékonyabban tudnák növelni az extracelluláris monoamin koncentrációt és hatásuk, a transzporterek elhelyezkedése miatt erőteljesebben javítaná a nem-szinaptikus kölcsönhatásokat, ami végeredményben a terápiás hatás megjelenésének gyorsulását és a terápia-rezisztens betegek számának csökkenését eredményezhetné.

6.3. A monoamin uptake gátlók nem-konvencionális központi idegrendszeri hatásai: új célpontok azonosítása a depresszió kezelésében

A DMPP hatásának elemzése során bukkantunk arra az érdekes és váratlan jelenségre, hogy a monoamin uptake gátlók nemcsak a carrier-mediálta komponenst gátolják, hanem a nAChR közvetítette választ is (Kiss és mtsai, 1997). Mivel a DMPP komplex hatásokkal rendelkezik, a továbbiakban a nikotin-kiváltotta transzmitter felszabadulást használtuk, és ezen technika segítségével kívántuk egyrészt kvantitatívan jellemezni az uptake gátlók nAChR antagonistá erősségét, másrészt elemezni az uptake gátlók hatásmechanizmusát. Megállapítottuk, hogy a monoamin uptake gátlók kémiai szerkezetüktől és szelektivitásuktól függetlenül gátolni képesek a központi idegrendszer nAChR-ait az alacsony mikromólos koncentráció-tartományban (Hennings és mtsai, 1997; Hennings és mtsai, 1999; Szasz és mtsai, 2007b). Mivel az antidepresszáns terápia során az agyban kialakulhat ez a koncentráció, a hatásnak szerepe lehet az antidepresszánsok klinikai hatásának kifejlődésében. A hatásmechanizmust elemezve kizártuk a transzporterek közvetítő szerepét és a Na^+ -csatornák esetleges érintettségét (Mike és mtsai, 2003; Lenkey és mtsai, 2006), és végül (részben az irodalmi adatokra támaszkodva) arra a következtetésre jutottunk, hogy a monoamin uptake gátlók a nAChR csatornájába kötődve gátolják meg a receptor működését. Ez a felismerésünk egyfajta farmakológiai bizonyítékát szolgáltatja annak az elképzelésnek, miszerint a monoamin transzporterek csatorna sajátosságokkal rendelkeznek, és e csatornák gátlása lenne az uptake inhibitorok elsődleges hatásmechanizmusa.

Habár struktúrájuk különbözik, az NMDA receptorok bizonyos farmakológiai tulajdonságaikban hasonlóságot mutatnak a nAChR-okkal. Megfigyelések szerint specifikus csatornablokkoló antagonistáik kölcsönösen gátolják mindkét receptort. Mivel a monoamin uptake gátlók ugyanezzel a mechanizmussal gátolják a nAChR-t, felmerült annak lehetősége, hogy az NMDA receptorok működését is befolyásolhatják. A triciklikusok szerekekkel kapcsolatban már le is írtak ilyen hatást, azonban egyéb, nagyobb szelektivitással és kevesebb mellékhatással rendelkező antidepresszánsok esetén még nem. Ezért határoztuk el, hogy a

triciklikus desipraminnal összehasonlítva megvizsgáljuk, vajon az SSRI fluoxetin is képes-e az NMDA receptorok befolyásolására. Elektrofiziológiai adataink szerint mind a fluoxetin, mind a desipramin képes az NMDA receptorok gátlására az alacsony mikromólos koncentráció-tartományban, azonban kötőhelyeik nagy valószínűséggel nem azonosak, ugyanis a desipramin feszültségfüggő módon gátolta az NMDA-áramokat, míg a fluoxetin hatása nem függött a membránpotenciál értékétől. Ezen kívül a Mg^{2+} teljes mértékben megakadályozta a desipramin kötődését az NMDA receptorhoz, míg a fluoxetin még Mg^{2+} jelenlétében is képes volt az asszociációra (Szasz és mtsai, 2007a). A Woodhull-modell alkalmazásával arra a következtetésre jutottunk, hogy a desipramin mélyen az NMDA receptor csatornájába kötődik, a fluoxetin viszont felületesen, az extracelluláris oldalon kapcsolódik a receptorhoz. Mivel az NMDA receptorok gátlásához szükséges koncentráció kialakul az agyban antidepresszáns terápia során, e szerek NMDA antagonista tulajdonsága hozzájárulhat a klinikai hatás kifejlődéséhez.

A nAChR-ral és az NMDA receptorral kapcsolatos kutatásaink elősegíthetik a depresszió neurokémiai hátterének jobb megértését, hozzájárulhatnak új központi idegrendszeri célpontok azonosításához és alapját képezhetik új terápiás eljárások kifejlesztésének.

6.4. A szerotonin transzporterek heterológ NA felvételi képessége: az SSRI vegyületek hatásmechanizmusával kapcsolatos klinikai vonatkozások

Ebben a kísérletsorozatban a noradrenerg rendszer funkcionális tulajdonságait kívántuk vizsgálni genetikailag módosított, noradrenalin transzportert nem expresszáló (NET KO) egerekben. *In vitro* szeletkísérletekben mértük a [3H]NA felvételt és felszabadulást NET KO és vad típusú (WT) egerekből kipreparált hippocampus és frontális kéreg szeletekben. Ezen kívül vizsgáltuk a preszinaptikus α_2 -adenoreceptorok által közvetített negatív visszacsatolást *in vitro* és *in vivo*.

Megfigyeléseink szerint a NET KO állatokban a [3H]NA felvétel jelentősen csökkent mindkét agyterületen (a hippocampusban mintegy tizedére, a kéregben kb. egyharmadára), azonban még így is jelentős maradt. Ez a reziduális felvétel neuronálisnak bizonyult, mivel NET, SERT és DAT gátlókból álló koktél jelenlétében egy minimális aspecifikus felvételtől eltekintve teljesen eltűnt. Kiderült, hogy az SSRI citalopram önmagában ugyanígy teljes mértékben megakadályozta a reziduális felvételt. A neuronális [3H]NA felszabadulás szintén

csökkent a NET KO állatokban, habár kisebb mértékben (kb. harmadára a hippocampusban és háromnegyedére a kéregben), mint az uptake. Ugyanakkor az elektromos ingerlés-kiváltotta [³H]NA felszabadulás teljes mértékben eltűnt mind az uptake gátló koktél, mind a citalopram jelenlétében. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a [³H]NA-t a szerotonerg varikozitások vették fel és később onnan is szabadult fel az ingerlés hatására. Ezt az eredményünket támasztotta alá a preszinaptikus α_2 -adrenoceptorok funkciójának tanulmányozása is. A NET KO állatokban az α_2 -adrenoceptor antagonistá CH-38083 ugyanis *in vitro* nem befolyásolta az elektromos ingerlés-kiváltotta [³H]NA felszabadulást, ugyanakkor jelentős mértékben, a WT egerekben tapasztaltnál erősebben fokozta az endogén NA felszabadulást *in vivo* mikrodialízis kísérletekben. Az eredmény értelmezéséhez fontos tudnunk, hogy a NET KO állatokban tapasztalható megemelkedett extracelluláris NA szint deszenzitizálja a szerotonerg varikozitásokon található α_2 -adrenoceptorokat, így ott nem működik a negatív visszacsatolás, ugyanakkor nem módosítja a noradrenerg varikozitásokon elhelyezkedő autoreceptorokat (Vizi és mtsai, 2004c). Ezek az adataink egyértelműen bizonyítják, hogy bizonyos körülmények között a szerotonerg varikozitásokon található SERT fel tudja venni a NA-t, ami azután elektromos impulzusra fel is tud szabadulni a szerotonerg idegsejtből.

A NA SERT általi heterológ visszavételének fontos klinikai vonatkozásai lehetnek, ugyanis a noradrenerg és szerotonerg rendszerek fontos szerepet játszanak a depresszió kórélettanában és modulációjuk képezi a jelenleg használatos antidepresszáns terápia fő csapásirányát. Mivel a szerotonerg terminálisok képesek a NA heterológ felvételére és felszabadítására, az SSRI vegyületek, nagyfokú szelektivitásuk dacára, javíthatják nemcsak a szerotonerg, hanem a noradrenerg ingerület-átvitelt is, legalábbis olyan agyterületeken, ahol a SERT sűrűsége lényegesen meghaladja a NET-ét. Ez a felismerésünk rávilágít az átfedő monoaminerg rendszerek közötti szoros együttműködésre és elősegítheti az SSRI vegyületek hatásmechanizmusának jobb megértését.

AZ ÉRTEKEZÉSBEN FELHASZNÁLT SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. **Kiss JP**, Sershen H, Lajtha A, Vizi ES (1996) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase potentiates the DMPP-evoked carrier-mediated release of noradrenaline from rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 215:115-118.
2. **Kiss JP**, Windisch K, Balla A, Sershen H, Lajtha A (1997) Dual effect of DMPP on the resting release of noradrenaline from rat hippocampal slices. *Brain Res Bull* 43:257-262.
3. Hennings ECP, **Kiss JP**, Vizi ES (1997) Nicotinic acetylcholine receptor antagonist effect of fluoxetine in rat hippocampal slices. *Brain Res* 759:292-294.
4. Vizi ES, **Kiss JP** (1998) Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and non-synaptic interactions. *Hippocampus* 8:566-607
5. **Kiss JP**, Hennings ECP, Zsilla G, Vizi ES (1999) A possible role of nitric oxide in the regulation of dopamine transporter function in the striatum. *Neurochem Int* 34:345-350.
6. Hennings ECP, **Kiss JP**, Tóth PT, De Oliveira K, Vizi ES (1999) Nicotinic acetylcholine receptor antagonistic activity of different monoamine uptake blockers in rat hippocampal slices. *J Neurochem* 73:1043-1050.
7. **Kiss JP** (2000) Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission. *Brain Res Bull* 52:459-466.
8. **Kiss JP**, Vizi ES (2001) Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. *Trends Neurosci* 24:211-215.
9. **Kiss JP**, Windisch K, De Oliveira K, Hennings ECP, Mike A, Szász BK (2001) Differential effect of nicotinic agonists on the [³H]norepinephrine release from rat hippocampal slices. *Neurochem Res* 26:943-950.
10. Mike A, Karoly R, Vizi ES, **Kiss JP** (2003) Inhibitory effect of the DA uptake blocker GBR 12909 on sodium channels of hippocampal neurons. *Neuroreport* 14:1945-1949.
11. **Kiss JP**, Zsilla G, Vizi ES (2004) Inhibitory effect of nitric oxide on dopamine transporters: interneuronal communication without receptors. *Neurochem Int* 45:485-489.
12. Vizi ES, **Kiss JP**, Lendvai B (2004) Nonsynaptic communication in the central nervous system. *Neurochem Int* 45:443-451.
13. Vizi ES, Zsilla G, Caron MG, **Kiss JP** (2004) Uptake and release of norepinephrine by serotonergic terminals in norepinephrine transporter knock-out mice: implications for the action of selective serotonin reuptake inhibitors. *J Neurosci* 24:7888-7894.
14. Szasz BK, Mayer A, Zsilla G, Lendvai B, Vizi ES, **Kiss JP** (2005) Carrier-mediated release of monoamines induced by the nicotinic acetylcholine receptor agonist DMPP. *Neuropharmacology* 49:400-409.
15. Lenkey N, Karoly R, **Kiss JP**, Szasz BK, Vizi ES, Mike A (2006) The mechanism of activity-dependent sodium channel inhibition by the antidepressants fluoxetine and desipramine. *Mol Pharmacol* 70:2052-2063.
16. Szasz BK, Vizi ES, **Kiss JP** (2007) Nicotinic acetylcholine receptor antagonistic property of the selective dopamine uptake inhibitor, GBR-12909 in rat hippocampal slices. *Neuroscience* 145:344-349.
17. **Kiss JP** (2007) Theory of active antidepressants: a nonsynaptic approach to the treatment of depression. *Neurochem Int* (e-pub ahead of print)

18. Szasz BK, Mike A, Karoly R, Gerevich Z, Illes P, Vizi ES, **Kiss JP** (2007) Direct inhibitory effect of fluoxetine on NMDA receptors in the central nervous system. *Biol Psychiatry* (e-pub ahead of print)

EGYÉB SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

19. Sándor NT, **Kiss J**, Sándor A, Lendvai B, Vizi ES (1991) Naloxone enhances the release of acetylcholine from cholinergic interneurons of the striatum if the dopaminergic input is impaired. *Brain Res* 552:343-345.
20. Sándor NT, Zelles T, **Kiss J**, Serksen H, Torocsik A, Lajtha A, Vizi ES (1991) Effect of nicotine on dopaminergic-cholinergic interaction in the striatum. *Brain Res* 567:313-316.
21. Vizi ES, **Kiss J**, Elenkov IJ (1991) Presynaptic Modulation of Cholinergic and Noradrenergic Neurotransmission: Interaction Between Them. *News Physiol Sci* 6:119-123.
22. Elenkov IJ, Kovács KJ, **Kiss J**, Bertók L, Vizi ES (1992) Lipopolysaccharide is able to bypass corticotropin-releasing factor in affecting plasma ACTH and corticosterone levels: evidence from rats with lesions of paraventricular nucleus. *J Endocrinol* 133: 231-236.
23. Elenkov IJ, **Kiss J**, Stark E, Bertók L (1992) CRF-dependent and CRF-independent mechanisms involved in hypophysial-adrenal system activation by bacterial endotoxin. *Acta Physiol Hung* 79:355-363.
24. **Kiss JP**, Tóth E, Lajtha A, Vizi ES (1994) NMDA receptors are not involved in the MK-801-induced increase of striatal dopamine release in rat: a microdialysis study. *Brain Res* 641:145-148.
25. **Kiss JP**, Zsilla G, Mike A, Zelles T, Tóth E, Lajtha A, Vizi ES (1995) Subtype specificity of the presynaptic α_2 -adrenoceptors modulating hippocampal norepinephrine release in rat. *Brain Res* 674:238-244.

PhD fokozat megszerzése óta megjelent munkák

26. **Kiss JP**, Vizi ES, Westerink BHC (1999) Effect of neostigmine on the hippocampal noradrenaline release: role of cholinergic receptors. *Neuroreport* 10:81-86.
27. Kalász H, Bartók T, Komoróczy R, Szókö É, Haberle D, **Kiss JP**, Hennings ECP, Magyar K, Fürst S (1999) Analysis of deprenyl metabolites in the rat brain using HPLC-ES-MS. *Curr Med Chem* 6:271-278.
28. Szelényi J, **Kiss JP**, Vizi ES (2000) Differential involvement of sympathetic nervous system and immune system in the modulation of TNF- α production by α_2 - and β -adrenoceptors in mice. *J Neuroimmunol* 103:34-40.
29. Szelényi J, **Kiss JP**, Puskás É, Selmeczy Z, Szelényi M, Vizi ES (2000) Opposite role of α_2 - and β -adrenoceptors in the modulation of IL-10 production in endotoxaemic mice. *Neuroreport* 11:3565-3568
30. Szelényi J, **Kiss JP**, Puskás É, Szelényi M, Vizi ES (2000) Contribution of differentially localized α_2 - and β -adrenoceptors in the modulation of TNF- α and IL-10 production in endotoxaemic mice. *Ann N Y Acad Sci* 917:145-153.
31. Gerevich Z, Tretter L, Ádám-Vizi V, Baranyi M, **Kiss JP**, Zelles T, Vizi ES (2001) Analysis of high intracellular $[Na^+]$ -induced release of $[^3H]$ noradrenaline in rat hippocampal slices. *Neuroscience* 104:761-768.

32. Rakovska A, **Kiss JP**, Raichev P, Lazarova M, Kalfin R, Milenov K (2002) Somatostatin stimulates striatal acetylcholine release by glutamatergic receptors: an in vivo microdialysis study in freely moving rats. *Neurochem Int* 40:267-273.
33. Rakovska A, **Kiss JP**, Raichev P, Lazarova M, Kalfin R, Djambazova E (2002) The non-competitive AMPA receptor antagonist (GYKI 52466) blocks quisqualate-induced acetylcholine release from the rat hippocampus and striatum: an in vivo microdialysis study. *Neurochem Int* 40:419-426
34. Mandl P, **Kiss JP**, Vizi ES (2003) Functional neurochemical evidence for the presence of presynaptic nicotinic acetylcholine receptors at the terminal region of myenteric motoneurons: a study with epibatidine. *Neurochem Res* 28:407-412.
35. Mike A, Karoly R, Vizi ES, **Kiss JP** (2004) A novel modulatory mechanism of sodium currents: Frequency-dependence without state-dependent binding. *Neuroscience* 125:1019-1028.
36. Vizi ES, Rózsa B, Mayer A, **Kiss JP**, Zelles T, Lendvai B (2004) Further evidence for the functional role of nonsynaptic nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol* 500:499-508.
37. Mandl P, **Kiss JP** (2006) Inhibitory effect of hemicholinium-3 on presynaptic nicotinic acetylcholine receptors located on the terminal region of myenteric motoneurons. *Neurochem Int* 49:327-333.
38. Mandl P, **Kiss JP** (2007) Role of presynaptic nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of gastrointestinal motility. *Brain Res Bull* 72:194-200.

KÖNYVFEJEZETEK

39. Vizi ES, Elenkov IJ, Oberfrank F, **Kiss J**, Hársing LG Jr (1991) Role of presynaptic α_2 heteroreceptors in nonsynaptic modulation of transmitter release. *Adv Biosci* 82:297-301.
40. **Kiss JP**, Tarkovác G, Varga G, Haskó G, Kovács G, Szántay Cs, Vizi ES (1995) Pharmacological characterization and therapeutical indications of a selective α_2 -adrenoceptor antagonist; the berbaine derivative CH-38083. in R & D in the Pharmaceutical Industry of Korea and Hungary p:135-141.
41. **Kiss J**, Sperlág B (1997) Neurotranszmitterek és receptoraik: Noradrenalin. in Vizi ES (ed.) Humán farmakológia: a racionális gyógyszerterápia alapjai. Medicina, Budapest, p:165-178.
42. **Kiss J** (1997) Neurotranszmitterek és receptoraik: Gázhalmazállapotú mediátorok. Nitrogénmonoxid (NO). Szénmonoxid (CO). in Vizi ES (ed.) Humán farmakológia: a racionális gyógyszerterápia alapjai. Medicina, Budapest, p:213-216.
43. Tímár J, Vizi ES, Sperlág B, **Kiss J**, Zelles T (2001) Bevezetés a pszichotróp szerek farmakológiájába. in Farmakológia. Ed. Fürst Zs., Medicina, Budapest, p:317-337.
44. **Kiss JP** (2007) Nitric oxide and other diffusible messengers. in Lajtha A, Hamon M, Vizi ES (eds) Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology, Neurotransmitter Systems. Springer (in press)

38 cikk, 6 könyvfejezet, összimpakt 124.561, összidézettség 976, ebből független idézet 781

IRODALOMJEGYZÉK

- Agnati LF, Fuxe K, Zoli M, Ozini I, Toffano G, Ferraguti F (1986) A correlation analysis of the regional distribution of central enkephalin and beta-endorphin immunoreactive terminals and of opiate receptors in adult and old male rats. Evidence for the existence of two main types of communication in the central nervous system: the volume transmission and the wiring transmission. *Acta Physiol Scand* 128:201-7.
- Amara SG, Arriza JL (1993) Neurotransmitter transporters: three distinct gene families. *Curr Opin Neurobiol* 3:337-44.
- Amara SG, Kuhar MJ (1993) Neurotransmitter transporters: recent progress. *Annu Rev Neurosci* 16:73-93.
- Andersen PH (1989) The dopamine inhibitor GBR 12909: selectivity and molecular mechanism of action. *Eur J Pharmacol* 166:493-504.
- Aronstam RS (1981) Interactions of tricyclic antidepressants with a synaptic ion channel. *Life Sci* 28:59-64.
- Asztely F, Erdemli G, Kullmann DM (1997) Extrasynaptic glutamate spillover in the hippocampus: dependence on temperature and the role of active glutamate uptake. *Neuron* 18:281-93.
- Audet MA, Doucet G, Oleskevich S, Descarries L (1988) Quantified regional and laminar distribution of the noradrenaline innervation in the anterior half of the adult rat cerebral cortex. *J Comp Neurol* 274:307-18.
- Audet MA, Descarries L, Doucet G (1989) Quantified regional and laminar distribution of the serotonin innervation in the anterior half of adult rat cerebral cortex. *J Chem Neuroanat* 2:29-44.
- Babbedge RC, Bland-Ward PA, Hart SL, Moore PK (1993) Inhibition of rat cerebellar nitric oxide synthase by 7-nitro indazole and related substituted indazoles. *Br J Pharmacol* 110:225-8.
- Bach-y-Rita P (1993) Nonsynaptic diffusion neurotransmission (NDN) in the brain. *Neurochem Int* 23:297-318.
- Banerjee S, Punzi JS, Kreilick K, Abood LG (1990) [3H]mecamylamine binding to rat brain membranes. Studies with mecamylamine and nicotine analogues. *Biochem Pharmacol* 40:2105-10.
- Berger B, Glowinski J (1978) Dopamine uptake in serotonergic terminals in vitro: a valuable tool for the histochemical differentiation of catecholaminergic and serotonergic terminals in rat cerebral structures. *Brain Res* 147:29-45.
- Berman RM, Cappiello A, Anand A, et al (2000) Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry* 47:351-4.
- Berman SB, Zigmond MJ, Hastings TG (1996) Modification of dopamine transporter function: effect of reactive oxygen species and dopamine. *J Neurochem* 67:593-600.
- Besret L, Debruyne D, Rioux P, et al (1996) A comprehensive investigation of plasma and brain regional pharmacokinetics of imipramine and its metabolites during and after chronic administration in the rat. *J Pharm Sci* 85:291-5.

- Black MD, Matthews EK, Humphrey PP (1994) The effects of a photosensitive nitric oxide donor on basal and electrically-stimulated dopamine efflux from the rat striatum in vitro. *Neuropharmacology* 33:1357-65.
- Blazer DG, Kessler RC, McGonagle KA, Swartz MS (1994) The prevalence and distribution of major depression in a national community sample: the National Comorbidity Survey. *Am J Psychiatry* 151:979-86.
- Blier P, Bouchard C (1994) Modulation of 5-HT release in the guinea-pig brain following long-term administration of antidepressant drugs. *Br J Pharmacol* 113:485-95.
- Bobula B, Tokarski K, Hess G (2003) Repeated administration of antidepressants decreases field potentials in rat frontal cortex. *Neuroscience* 120:765-9.
- Boehm S (1999) Presynaptic α_2 -adrenoceptors control excitatory, but not inhibitory, transmission at rat hippocampal synapses. *J Physiol (London)* 519 Pt 2:439-49.
- Bolden-Watson C, Richelson E (1993) Blockade by newly-developed antidepressants of biogenic amine uptake into rat brain synaptosomes. *Life Sci* 52:1023-9.
- Bolo NR, Hode Y, Nedelec JF, Laine E, Wagner G, Macher JP (2000) Brain pharmacokinetics and tissue distribution in vivo of fluvoxamine and fluoxetine by fluorine magnetic resonance spectroscopy. *Neuropsychopharmacology* 23:428-38.
- Brennan JE, Brecht DS (1997) Synaptic signaling by nitric oxide. *Curr Opin Neurobiol* 7:374-8.
- Buck KJ, Amara SG (1994) Chimeric dopamine-norepinephrine transporters delineate structural domains influencing selectivity for catecholamines and 1-methyl-4-phenylpyridinium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12584-8.
- Bunin MA, Wightman RM (1999) Paracrine neurotransmission in the CNS: involvement of 5-HT. *Trends Neurosci* 22:377-82.
- Buyuktuysal RL (1997) Effect of nitric oxide donors on endogenous dopamine release from rat striatal slices. II: The role of voltage-dependent sodium channels, calcium channel activation, reverse transport mechanism, guanylate cyclase and endogenous glutamate. *Fundam Clin Pharmacol* 11:528-36.
- Cai Z, McCaslin PP (1992) Amitriptyline, desipramine, cyproheptadine and carbamazepine, in concentrations used therapeutically, reduce kainate- and N-methyl-D-aspartate-induced intracellular Ca^{2+} levels in neuronal culture. *Eur J Pharmacol* 219:53-7.
- Calabresi P, Centonze D, Bernardi G (2000) Electrophysiology of dopamine in normal and denervated striatal neurons. *Trends Neurosci* 23:S57-63.
- Campbell IC, McKernan RM (1986) Clorgyline and desipramine alter the sensitivity of [3H]noradrenaline release to calcium but not to clonidine. *Brain Res* 372:253-9.
- Carboni E, Tanda GL, Frau R, Di Chiara G (1990) Blockade of the noradrenaline carrier increases extracellular dopamine concentrations in the prefrontal cortex: evidence that dopamine is taken up in vivo by noradrenergic terminals. *J Neurochem* 55:1067-70.
- Carboni E, Spilewoy C, Vacca C, Nosten-Bertrand M, Giros B, Di Chiara G (2001) Cocaine and amphetamine increase extracellular dopamine in the nucleus accumbens of mice lacking the dopamine transporter gene. *J Neurosci* 21:RC141: 1-4.

- Carrier GO, Ikeda SR (1992) TTX-sensitive Na⁺ channels and Ca²⁺ channels of the L- and N-type underlie the inward current in acutely dispersed coeliac-mesenteric ganglia neurons of adult rats. *Pflugers Arch* 421:7-16.
- Carvelli L, McDonald PW, Blakely RD, Defelice LJ (2004) Dopamine transporters depolarize neurons by a channel mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16046-51.
- Castren E (2005) Is mood chemistry? *Nat Rev Neurosci* 6:241-6.
- Castren E, Voikar V, Rantamaki T (2007) Role of neurotrophic factors in depression. *Curr Opin Pharmacol* 7:18-21.
- Chaparro-Huerta V, Beas-Zarate C, Guerrero MU, Feria-Velasco A (1997) Nitric oxide involvement in regulating the dopamine transport in the striatal region of rat brain. *Neurochem Int* 31:607-16.
- Chen B, Dowlatsahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT (2001) Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry* 50:260-5.
- Ciliax BJ, Heilman C, Demchyshyn LL, et al (1995) The dopamine transporter: immunochemical characterization and localization in brain. *J Neurosci* 15:1714-23.
- Clarke PB, Reuben M (1996) Release of [3H]-noradrenaline from rat hippocampal synaptosomes by nicotine: mediation by different nicotinic receptor subtypes from striatal [3H]-dopamine release. *Br J Pharmacol* 117:595-606.
- Cohen BN, Figl A, Quick MW, Labarca C, Davidson N, Lester HA (1995) Regions of beta 2 and beta 4 responsible for differences between the steady state dose-response relationships of the alpha 3 beta 2 and alpha 3 beta 4 neuronal nicotinic receptors. *J Gen Physiol* 105:745-64.
- Corringer PJ, Bertrand S, Bohler S, Edelstein SJ, Changeux JP, Bertrand D (1998) Critical elements determining diversity in agonist binding and desensitization of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* 18:648-57.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11:327-35.
- Dani JA, Radcliffe KA, Pidoplichko VI (2000) Variations in desensitization of nicotinic acetylcholine receptors from hippocampus and midbrain dopamine areas. *Eur J Pharmacol* 393:31-8.
- Dawson TM, Brecht DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH (1991) Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7797-801.
- De Belleruche J, Bradford HF (1978) Biochemical evidence for the presence of presynaptic receptors on dopaminergic nerve terminals. *Brain Res* 142:53-68.
- de Boer TH, Nefkens F, van Helvoirt A, van Delft AM (1996) Differences in modulation of noradrenergic and serotonergic transmission by the alpha-2 adrenoceptor antagonists, mirtazapine, mianserin and idazoxan. *J Pharmacol Exp Ther* 277:852-60.
- DeFelice LJ, Blakely RD (1996) Pore models for transporters? *Biophys J* 70:579-80.
- Deffois A, Fage D, Carter C (1996) Inhibition of synaptosomal veratridine-induced sodium influx by antidepressants and neuroleptics used in chronic pain. *Neurosci Lett* 220:117-20.

- Descarries L, Lemay B, Doucet G, Berger B (1987) Regional and laminar density of the dopamine innervation in adult rat cerebral cortex. *Neuroscience* 21:807-24.
- Doris A, Ebmeier K, Shajahan P (1999) Depressive illness. *Lancet* 354:1369-75.
- Doucet G, Descarries L, Garcia S (1986) Quantification of the dopamine innervation in adult rat neostriatum. *Neuroscience* 19:427-45.
- Doucet G, Descarries L, Audet MA, Garcia S, Berger B (1988) Radioautographic method for quantifying regional monoamine innervations in the rat brain. Application to the cerebral cortex. *Brain Res* 441:233-59.
- Fenster CP, Rains MF, Noerager B, Quick MW, Lester RA (1997) Influence of subunit composition on desensitization of neuronal acetylcholine receptors at low concentrations of nicotine. *J Neurosci* 17:5747-59.
- Feuerstein TJ, Hertting G, Lupp A, Neufang B (1986) False labelling of dopaminergic terminals in the rabbit caudate nucleus: uptake and release of [3H]-5-hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol* 88:677-84.
- Fielding S, Szewczak MR (1984) Pharmacology of nomifensine: a review of animal studies. *J Clin Psychiatry* 45:12-20.
- Fischer W, Franke H, Scheibler P, Allgaier C, Illes P (2002) AMPA-induced Ca(2+) influx in cultured rat cortical nonpyramidal neurones: pharmacological characterization using fura-2 microfluorimetry. *Eur J Pharmacol* 438:53-62.
- Fleckenstein AE, Metzger RR, Beyeler ML, Gibb JW, Hanson GR (1997a) Oxygen radicals diminish dopamine transporter function in rat striatum. *Eur J Pharmacol* 334:111-4.
- Fleckenstein AE, Metzger RR, Wilkins DG, Gibb JW, Hanson GR (1997b) Rapid and reversible effects of methamphetamine on dopamine transporters. *J Pharmacol Exp Ther* 282:834-8.
- Frankhuyzen AL, Mulder AH (1982) Pharmacological characterization of presynaptic alpha-adrenoceptors modulating [3H]noradrenaline and [3H]5-hydroxytryptamine release from slices of the hippocampus of the rat. *Eur J Pharmacol* 81:97-106.
- Fryer JD, Lukas RJ (1999a) Antidepressants noncompetitively inhibit nicotinic acetylcholine receptor function. *J Neurochem* 72:1117-24.
- Fryer JD, Lukas RJ (1999b) Noncompetitive functional inhibition at diverse, human nicotinic acetylcholine receptor subtypes by bupropion, phencyclidine, and ibogaine. *J Pharmacol Exp Ther* 288:88-92.
- Galli A, DeFelice LJ, Duke BJ, Moore KR, Blakely RD (1995) Sodium-dependent norepinephrine-induced currents in norepinephrine-transporter-transfected HEK-293 cells blocked by cocaine and antidepressants. *J Exp Biol* 198:2197-212.
- Gally JA, Montague PR, Reeke GN, Jr., Edelman GM (1990) The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:3547-51.
- Garthwaite J, Boulton CL (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 57:683-706.
- Gerevich Z, Tretter L, Adam-Vizi V, et al (2001) Analysis of high intracellular [Na⁺]-induced release of [3H]noradrenaline in rat hippocampal slices. *Neuroscience* 104:761-8.

- Gnegy ME (2003) The effect of phosphorylation on amphetamine-mediated outward transport. *Eur J Pharmacol* 479:83-91.
- Gogas KR (2006) Glutamate-based therapeutic approaches: NR2B receptor antagonists. *Curr Opin Pharmacol* 6:68-74.
- Grady S, Marks MJ, Wonnacott S, Collins AC (1992) Characterization of nicotinic receptor-mediated [3H]dopamine release from synaptosomes prepared from mouse striatum. *J Neurochem* 59:848-56.
- Griffith OW, Stuehr DJ (1995) Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 57:707-36.
- Guevara-Guzman R, Emson PC, Kendrick KM (1994) Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. *J Neurochem* 62:807-10.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.
- Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5:405-14.
- Hennings EC, Kiss JP, Vizi ES (1997) Nicotinic acetylcholine receptor antagonist effect of fluoxetine in rat hippocampal slices. *Brain Res* 759:292-4.
- Hennings EC, Kiss JP, De Oliveira K, Toth PT, Vizi ES (1999) Nicotinic acetylcholine receptor antagonistic activity of monoamine uptake blockers in rat hippocampal slices. *J Neurochem* 73:1043-50.
- Herkenham M (1987) Mismatches between neurotransmitter and receptor localizations in brain: observations and implications. *Neuroscience* 23:1-38.
- Hindmarch I (2001) Expanding the horizons of depression: beyond the monoamine hypothesis. *Hum Psychopharmacol* 16:203-218.
- Holbach HJ, Lindmar R, Loffelholz K (1977) DMPP and the adrenergic nerve terminal: mechanisms of noradrenaline release from vesicular and extravesicular compartments. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 300:131-8.
- Hyttel J (1977) Neurochemical characterization of a new potent and selective serotonin uptake inhibitor: Lu 10-171. *Psychopharmacology (Berl)* 51:225-33.
- Hyttel J (1982) Citalopram--pharmacological profile of a specific serotonin uptake inhibitor with antidepressant activity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 6:277-95.
- Izaguirre V, Fernandez-Fernandez JM, Cena V, Gonzalez-Garcia C (1997) Tricyclic antidepressants block cholinergic nicotinic receptors and ATP secretion in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett* 418:39-42.
- Kashihara K, Hamamura T, Okumura K, Otsuki S (1990) Effect of MK-801 on endogenous dopamine release in vivo. *Brain Res* 528:80-2.
- Kaye DM, Gruskin S, Smith AI, Esler MD (2000) Nitric oxide mediated modulation of norepinephrine transport: identification of a potential target for S-nitrosylation. *Br J Pharmacol* 130:1060-4.
- Kenny PJ, File SE, Neal MJ (2000) Evidence for a complex influence of nicotinic acetylcholine receptors on hippocampal serotonin release. *J Neurochem* 75:2409-14.

- Kiss JP, Toth E, Lajtha A, Vizi ES (1994) NMDA receptors are not involved in the MK-801-induced increase of striatal dopamine release in rat: a microdialysis study. *Brain Res* 641:145-8.
- Kiss JP, Zsilla G, Mike A, et al (1995) Subtype-specificity of the presynaptic alpha 2-adrenoceptors modulating hippocampal norepinephrine release in rat. *Brain Res* 674:238-44.
- Kiss JP, Sershen H, Lajtha A, Vizi ES (1996) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase potentiates the dimethylphenylpiperazinium-evoked carrier-mediated release of noradrenaline from rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 215:115-8.
- Kiss JP, Windisch K, Balla A, Sershen H, Lajtha A (1997) Dual effect of DMPP on the resting release of noradrenaline from rat hippocampal slices. *Brain Res Bull* 43:257-62.
- Kiss JP, Hennings EC, Zsilla G, Vizi ES (1999) A possible role of nitric oxide in the regulation of dopamine transporter function in the striatum. *Neurochem Int* 34:345-50.
- Kiss JP (2000) Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission. *Brain Res Bull* 52:459-66.
- Kiss JP, Vizi ES (2001) Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. *Trends Neurosci* 24:211-5.
- Kiss JP, Windisch K, De Oliveira K, Hennings EC, Mike A, Szasz BK (2001) Differential effect of nicotinic agonists on the [3H]norepinephrine release from rat hippocampal slices. *Neurochem Res* 26:943-50.
- Kiss JP, Zsilla G, Vizi ES (2004) Inhibitory effect of nitric oxide on dopamine transporters: interneuronal communication without receptors. *Neurochem Int* 45:485-9.
- Kiss JP (2007) Theory of active antidepressants: A nonsynaptic approach to the treatment of depression. *Neurochem Int*.
- Knoll J, Vizi ES (1971) Effect of frequency of stimulation on the inhibition by noradrenaline of the acetylcholine output from parasympathetic nerve terminals. *Br J Pharmacol* 42:263-72.
- Kulak JM, Nguyen TA, Olivera BM, McIntosh JM (1997) Alpha-conotoxin MII blocks nicotine-stimulated dopamine release in rat striatal synaptosomes. *J Neurosci* 17:5263-70.
- Kullmann DM, Asztely F (1998) Extrasynaptic glutamate spillover in the hippocampus: evidence and implications. *Trends Neurosci* 21:8-14.
- Langeloh A, Trendelenburg U (1987) The mechanism of the 3H-noradrenaline releasing effect of various substrates of uptake1: role of monoamine oxidase and of vesicularly stored 3H-noradrenaline. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 336:611-20.
- Layer RT, Popik P, Olds T, Skolnick P (1995) Antidepressant-like actions of the polyamine site NMDA antagonist, eliprodil (SL-82.0715). *Pharmacol Biochem Behav* 52:621-7.
- Le Novère N, Corringer PJ, Changeux JP (2002) The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol* 53:447-56.

- Lendvai B, Sershen H, Lajtha A, Santha E, Baranyi M, Vizi ES (1996) Differential mechanisms involved in the effect of nicotinic agonists DMPP and lobeline to release [3H]5-HT from rat hippocampal slices. *Neuropharmacology* 35:1769-77.
- Lenkey N, Karoly R, Kiss JP, Szasz BK, Vizi ES, Mike A (2006) The mechanism of activity-dependent sodium channel inhibition by the antidepressants fluoxetine and desipramine. *Mol Pharmacol* 70:2052-63.
- Lerner-Marmarosh N, Carroll FI, Abood LG (1995) Antagonism of nicotine's action by cocaine analogs. *Life Sci* 56:PL67-70.
- Lester HA, Cao Y, Mager S (1996) Listening to neurotransmitter transporters. *Neuron* 17:807-10.
- Levi G, Raiteri M (1993) Carrier-mediated release of neurotransmitters. *Trends Neurosci* 16:415-9.
- Lindstrom J, Anand R, Gerzanich V, Peng X, Wang F, Wells G (1996) Structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Prog Brain Res* 109:125-37.
- Li-Smerin Y, Johnson JW (1996) Kinetics of the block by intracellular Mg^{2+} of the NMDA-activated channel in cultured rat neurons. *J Physiol (London)* 491 (Pt 1):121-35.
- Lonart G, Cassels KL, Johnson KM (1993) Nitric oxide induces calcium-dependent [3H]dopamine release from striatal slices. *J Neurosci Res* 35:192-8.
- Lonart G, Johnson KM (1994) Inhibitory effects of nitric oxide on the uptake of [3H]dopamine and [3H]glutamate by striatal synaptosomes. *J Neurochem* 63:2108-17.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Luo S, Kulak JM, Cartier GE, et al (1998) alpha-conotoxin A α IB selectively blocks α 3 β 4 nicotinic acetylcholine receptors and nicotine-evoked norepinephrine release. *J Neurosci* 18:8571-9.
- MacKenzie GM, Rose S, Bland-Ward PA, Moore PK, Jenner P, Marsden CD (1994) Time course of inhibition of brain nitric oxide synthase by 7-nitro indazole. *Neuroreport* 5:1993-6.
- Mager S, Min C, Henry DJ, et al (1994) Conducting states of a mammalian serotonin transporter. *Neuron* 12:845-59.
- Maj J, Rogoz Z, Skuza G, Sowinska H (1992) Effects of MK-801 and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 2:37-41.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20:9104-10.
- Malberg JE, Blendy JA (2005) Antidepressant action: to the nucleus and beyond. *Trends Pharmacol Sci* 26:631-8.
- Maldonado R (2003) The neurobiology of addiction. *J Neural Transm Suppl*:1-14.
- Manji HK, Quiroz JA, Sporn J, et al (2003) Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult-to-treat depression. *Biol Psychiatry* 53:707-42.

- Marks MJ, Grady SR, Yang JM, Lippiello PM, Collins AC (1994) Desensitization of nicotine-stimulated $^{86}\text{Rb}^{+}$ efflux from mouse brain synaptosomes. *J Neurochem* 63:2125-35.
- Maura G, Gemignani A, Raiteri M (1982) Noradrenaline inhibits central serotonin release through α 2-adrenoceptors located on serotonergic nerve terminals. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 320:272-4.
- McLean S, Rothman RB, Jacobson AE, Rice KC, Herkenham M (1987) Distribution of opiate receptor subtypes and enkephalin and dynorphin immunoreactivity in the hippocampus of squirrel, guinea pig, rat, and hamster. *J Comp Neurol* 255:497-510.
- Michael-Titus AT, Bains S, Jeetle J, Whelpton R (2000) Imipramine and phenelzine decrease glutamate overflow in the prefrontal cortex--a possible mechanism of neuroprotection in major depression? *Neuroscience* 100:681-4.
- Mike A, Karoly R, Vizi ES, Kiss JP (2003) Inhibitory effect of the DA uptake blocker GBR 12909 on sodium channels of hippocampal neurons. *Neuroreport* 14:1945-9.
- Millan MJ (2006) Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: Conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. *Pharmacol Ther* 110:135-370.
- Miller DK, Wong EH, Chesnut MD, Dwoskin LP (2002) Reboxetine: functional inhibition of monoamine transporters and nicotinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 302:687-95.
- Miller KJ, Hoffman BJ (1994) Adenosine A3 receptors regulate serotonin transport via nitric oxide and cGMP. *J Biol Chem* 269:27351-6.
- Milusheva E, Baranyi M, Zelles T, Mike A, Vizi ES (1994) Release of acetylcholine and noradrenaline from the cholinergic and adrenergic afferents in rat hippocampal CA1, CA3 and dentate gyrus regions. *Eur J Neurosci* 6:187-92.
- Mjellem N, Lund A, Hole K (1993) Reduction of NMDA-induced behaviour after acute and chronic administration of desipramine in mice. *Neuropharmacology* 32:591-5.
- Mongeau R, Blier P, de Montigny C (1993) In vivo electrophysiological evidence for tonic activation by endogenous noradrenaline of α 2-adrenoceptors on 5-hydroxytryptamine terminals in the rat hippocampus. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 347:266-72.
- Mongeau R, de Montigny C, Blier P (1994) Electrophysiologic evidence for desensitization of α 2-adrenoceptors on serotonin terminals following long-term treatment with drugs increasing norepinephrine synaptic concentration. *Neuropsychopharmacology* 10:41-51.
- Mongeau R, Blier P, de Montigny C (1997) The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments. *Brain Res Rev* 23:145-95.
- Morland J (2000) Toxicity of drug abuse--amphetamine designer drugs (ecstasy): mental effects and consequences of single dose use. *Toxicol Lett* 112-113:147-52.
- Moron JA, Brockington A, Wise RA, Rocha BA, Hope BT (2002) Dopamine uptake through the norepinephrine transporter in brain regions with low levels of the dopamine transporter: evidence from knock-out mouse lines. *J Neurosci* 22:389-95.

- Mundorf ML, Joseph JD, Austin CM, Caron MG, Wightman RM (2001) Catecholamine release and uptake in the mouse prefrontal cortex. *J Neurochem* 79:130-42.
- Muscettola G, Goodwin FK, Potter WZ, Claeys MM, Markey SP (1978) Imipramine and desipramine in plasma and spinal fluid: relationship to clinical response and serotonin metabolism. *Arch Gen Psychiatry* 35:621-5.
- Nelson H, Mandiyan S, Nelson N (1990) Cloning of the human brain GABA transporter. *FEBS Lett* 269:181-4.
- Nelson N (1998) The family of Na⁺/Cl⁻ neurotransmitter transporters. *J Neurochem* 71:1785-803.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002) Neurobiology of depression. *Neuron* 34:13-25.
- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS (1995) Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci* 15:7539-47.
- Nicholson C, Sykova E (1998) Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci* 21:207-15.
- Niebler M, Trendelenburg U (1990) Mechanisms of the release of 3H-noradrenaline by dimethylphenylpiperazinium (DMPP) in the rat vas deferens. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 341:43-9.
- Nowak G, Trullas R, Layer RT, Skolnick P, Paul IA (1993) Adaptive changes in the N-methyl-D-aspartate receptor complex after chronic treatment with imipramine and 1-aminocyclopropanecarboxylic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 265:1380-6.
- Ogata N, Yoshii M, Narahashi T (1989) Psychotropic drugs block voltage-gated ion channels in neuroblastoma cells. *Brain Res* 476:140-4.
- Oleskevich S, Descarries L, Lacaille JC (1989) Quantified distribution of the noradrenaline innervation in the hippocampus of adult rat. *J Neurosci* 9:3803-15.
- Oleskevich S, Descarries L (1990) Quantified distribution of the serotonin innervation in adult rat hippocampus. *Neuroscience* 34:19-33.
- Pacholczyk T, Blakely RD, Amara SG (1991) Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter. *Nature* 350:350-4.
- Page G, Barrier L, Morel P, Schulzberg M, Piriou A, Huguet F (1998) Possible relationship between changes in [3H]DA uptake and autoxidation in rat striatal slices. *Exp Neurol* 152:88-94.
- Palucha A, Pilc A (2005) The involvement of glutamate in the pathophysiology of depression. *Drug News Perspect* 18:262-8.
- Panconi E, Roux J, Altenbaumer M, Hampe S, Porsolt RD (1993) MK-801 and enantiomers: potential antidepressants or false positives in classical screening models? *Pharmacol Biochem Behav* 46:15-20.
- Pancrazio JJ, Kamatchi GL, Roscoe AK, Lynch C, 3rd (1998) Inhibition of neuronal Na⁺ channels by antidepressant drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 284:208-14.
- Papp M, Moryl E (1994) Antidepressant activity of non-competitive and competitive NMDA receptor antagonists in a chronic mild stress model of depression. *Eur J Pharmacol* 263:1-7.

- Park TJ, Shin SY, Suh BC, et al (1998) Differential inhibition of catecholamine secretion by amitriptyline through blockage of nicotinic receptors, sodium channels, and calcium channels in bovine adrenal chromaffin cells. *Synapse* 29:248-56.
- Pato MT, Murphy DL, DeVane CL (1991) Sustained plasma concentrations of fluoxetine and/or norfluoxetine four and eight weeks after fluoxetine discontinuation. *J Clin Psychopharmacol* 11:224-5.
- Paton WD, Vizi ES (1969) The inhibitory action of noradrenaline and adrenaline on acetylcholine output by guinea-pig ileum longitudinal muscle strip. *Br J Pharmacol* 35:10-28.
- Paul IA, Nowak G, Layer RT, Popik P, Skolnick P (1994) Adaptation of the N-methyl-D-aspartate receptor complex following chronic antidepressant treatments. *J Pharmacol Exp Ther* 269:95-102.
- Petersen CI, DeFelice LJ (1999) Ionic interactions in the Drosophila serotonin transporter identify it as a serotonin channel. *Nat Neurosci* 2:605-10.
- Pogun S, Baumann MH, Kuhar MJ (1994a) Nitric oxide inhibits [3H]dopamine uptake. *Brain Res* 641:83-91.
- Pogun S, Dawson V, Kuhar MJ (1994b) Nitric oxide inhibits 3H-glutamate transport in synaptosomes. *Synapse* 18:21-6.
- Popik P, Wrobel M, Nowak G (2000) Chronic treatment with antidepressants affects glycine/NMDA receptor function: behavioral evidence. *Neuropharmacology* 39:2278-87.
- Puttfarcken PS, Jacobs I, Faltynek CR (2000) Characterization of nicotinic acetylcholine receptor-mediated [(3)H]-dopamine release from rat cortex and striatum. *Neuropharmacology* 39:2673-80.
- Quick MW, Lester RA (2002) Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J Neurobiol* 53:457-78.
- Ramamoorthy S, Bauman AL, Moore KR, et al (1993) Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2542-6.
- Ramoa AS, Alkondon M, Aracava Y, et al (1990) The anticonvulsant MK-801 interacts with peripheral and central nicotinic acetylcholine receptor ion channels. *J Pharmacol Exp Ther* 254:71-82.
- Rana B, McMorn SO, Reeve HL, Wyatt CN, Vaughan PF, Peers C (1993) Inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by imipramine and desipramine. *Eur J Pharmacol* 250:247-51.
- Rao TS, Correa LD, Adams P, Santori EM, Sacaan AI (2003) Pharmacological characterization of dopamine, norepinephrine and serotonin release in the rat prefrontal cortex by neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonists. *Brain Res* 990:203-8.
- Rapier C, Lunt GG, Wonnacott S (1990) Nicotinic modulation of [3H]dopamine release from striatal synaptosomes: pharmacological characterisation. *J Neurochem* 54:937-45.
- Redmond AM, Kelly JP, Leonard BE (1997) Behavioural and neurochemical effects of dizocilpine in the olfactory bulbectomized rat model of depression. *Pharmacol Biochem Behav* 58:355-9.

- Reuben M, Clarke PB (2000) Nicotine-evoked [3H]5-hydroxytryptamine release from rat striatal synaptosomes. *Neuropharmacology* 39:290-9.
- Richardt G, Haass M, Neeb S, Hock M, Lang RE, Schomig A (1988) Nicotine-induced release of noradrenaline and neuropeptide Y in guinea pig heart. *Klin Wochenschr* 66 Suppl 11:21-7.
- Rogoz Z, Skuza G, Maj J, Danysz W (2002) Synergistic effect of uncompetitive NMDA receptor antagonists and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats. *Neuropharmacology* 42:1024-30.
- Rudnick G, Clark J (1993) From synapse to vesicle: the reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters. *Biochim Biophys Acta* 1144:249-63.
- Rusakov DA, Kullmann DM, Stewart MG (1999) Hippocampal synapses: do they talk to their neighbours? *Trends Neurosci* 22:382-8.
- Sacaan AI, Dunlop JL, Lloyd GK (1995) Pharmacological characterization of neuronal acetylcholine gated ion channel receptor-mediated hippocampal norepinephrine and striatal dopamine release from rat brain slices. *J Pharmacol Exp Ther* 274:224-30.
- Salamone JD, Correa M, Mingote SM, Weber SM (2005) Beyond the reward hypothesis: alternative functions of nucleus accumbens dopamine. *Curr Opin Pharmacol* 5:34-41.
- Sandor NT, Brassai A, Puskas A, Lendvai B (1995) Role of nitric oxide in modulating neurotransmitter release from rat striatum. *Brain Res Bull* 36:483-6.
- Santha E, Sperlagh B, Zelles T, et al (2000) Multiple cellular mechanisms mediate the effect of lobeline on the release of norepinephrine. *J Pharmacol Exp Ther* 294:302-7.
- Scanziani M, Gahwiler BH, Thompson SM (1993) Presynaptic inhibition of excitatory synaptic transmission mediated by alpha adrenergic receptors in area CA3 of the rat hippocampus in vitro. *J Neurosci* 13:5393-401.
- Scheibner J, Trendelenburg AU, Hein L, Starke K (2001) Alpha2-adrenoceptors modulating neuronal serotonin release: a study in alpha2-adrenoceptor subtype-deficient mice. *Br J Pharmacol* 132:925-33.
- Schildkraut JJ (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 122:509-22.
- Schmitt FO (1984) Molecular regulators of brain function: a new view. *Neuroscience* 13:991-1001.
- Schmitz D, Gloveli T, Empson RM, Draguhn A, Heinemann U (1998) Serotonin reduces synaptic excitation in the superficial medial entorhinal cortex of the rat via a presynaptic mechanism. *J Physiol (London)* 508 (Pt 1):119-29.
- Schneider JS, Rothblat DS, DiStefano L (1994) Volume transmission of dopamine over large distances may contribute to recovery from experimental parkinsonism. *Brain Res* 643:86-91.
- Schoffelmeer AN, Mulder AH (1982) 3H-Noradrenaline and 3H-5-hydroxytryptamine release from rat brain slices and its presynaptic alpha-adrenergic modulation after long-term desipramine pretreatment. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 318:173-80.
- Schulman H (1997) Nitric oxide: a spatial second messenger. *Mol Psychiatry* 2:296-9.

- Schuman EM, Madison DV (1994) Nitric oxide and synaptic function. *Annu Rev Neurosci* 17:153-83.
- Semyanov A, Kullmann DM (2000) Modulation of GABAergic signaling among interneurons by metabotropic glutamate receptors. *Neuron* 25:663-72.
- Sernagor E, Kuhn D, Vyklicky L, Jr., Mayer ML (1989) Open channel block of NMDA receptor responses evoked by tricyclic antidepressants. *Neuron* 2:1221-7.
- Sershen H, Balla A, Lajtha A, Vizi ES (1997) Characterization of nicotinic receptors involved in the release of noradrenaline from the hippocampus. *Neuroscience* 77:121-30.
- Sesack SR, Hawrylak VA, Matus C, Guido MA, Levey AI (1998) Dopamine axon varicosities in the prefrontal division of the rat prefrontal cortex exhibit sparse immunoreactivity for the dopamine transporter. *J Neurosci* 18:2697-708.
- Sharples CG, Kaiser S, Soliakov L, et al (2000) UB-165: a novel nicotinic agonist with subtype selectivity implicates the $\alpha 4\beta 2^*$ subtype in the modulation of dopamine release from rat striatal synaptosomes. *J Neurosci* 20:2783-91.
- Shimada S, Kitayama S, Lin CL, et al (1991) Cloning and expression of a cocaine-sensitive dopamine transporter complementary DNA. *Science* 254:576-8.
- Shytle RD, Silver AA, Sanberg PR (2000) Comorbid bipolar disorder in Tourette's syndrome responds to the nicotinic receptor antagonist mecamylamine (Inversine). *Biol Psychiatry* 48:1028-31.
- Shytle RD, Silver AA, Lukas RJ, Newman MB, Sheehan DV, Sanberg PR (2002) Nicotinic acetylcholine receptors as targets for antidepressants. *Mol Psychiatry* 7:525-35.
- Silva MT, Rose S, Hindmarsh JG, et al (1995) Increased striatal dopamine efflux in vivo following inhibition of cerebral nitric oxide synthase by the novel monosodium salt of 7-nitro indazole. *Br J Pharmacol* 114:257-8.
- Silva MT, Rose S, Hindmarsh JG, Jenner P, Marsden CD (1998) L-arginine produces NO-independent increases in dopamine efflux in rat striatum. *Neuroreport* 9:149-52.
- Singewald N, Sinner C, Hetzenauer A, Sartori SB, Murck H (2004) Magnesium-deficient diet alters depression- and anxiety-related behavior in mice--influence of desipramine and Hypericum perforatum extract. *Neuropharmacology* 47:1189-97.
- Singh SK, Yamashita A, Gouaux E (2007) Antidepressant binding site in a bacterial homologue of neurotransmitter transporters. *Nature* 448:952-6.
- Slemmer JE, Martin BR, Damaj MI (2000) Bupropion is a nicotinic antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 295:321-7.
- Snell LD, Johnson KM (1989) Effects of nicotinic agonists and antagonists on N-methyl-D-aspartate-induced 3H-norepinephrine release and 3H-(1-[1-(2-thienyl)cyclohexyl]-piperidine) binding in rat hippocampus. *Synapse* 3:129-35.
- Sobocki P, Jonsson B, Angst J, Rehnberg C (2006) Cost of depression in Europe. *J Ment Health Policy Econ* 9:87-98.
- Soliakov L, Gallagher T, Wonnacott S (1995) Anatoxin-a-evoked [3H]dopamine release from rat striatal synaptosomes. *Neuropharmacology* 34:1535-41.
- Sonders MS, Amara SG (1996) Channels in transporters. *Curr Opin Neurobiol* 6:294-302.

- Sonders MS, Zhu SJ, Zahniser NR, Kavanaugh MP, Amara SG (1997) Multiple ionic conductances of the human dopamine transporter: the actions of dopamine and psychostimulants. *J Neurosci* 17:960-74.
- Sora I, Hall FS, Andrews AM, et al (2001) Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5300-5.
- Starke K (1981) Presynaptic receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 21:7-30.
- Stewart TL, Michel AD, Black MD, Humphrey PP (1996) Evidence that nitric oxide causes calcium-independent release of [3H] dopamine from rat striatum in vitro. *J Neurochem* 66:131-7.
- Strasser A, McCarron RM, Ishii H, Stanimirovic D, Spatz M (1994) L-arginine induces dopamine release from the striatum in vivo. *Neuroreport* 5:2298-300.
- Stryjer R, Strous RD, Shaked G, et al (2003) Amantadine as augmentation therapy in the management of treatment-resistant depression. *Int Clin Psychopharmacol* 18:93-6.
- Su C, Bevan JA (1970) Blockade of the nicotine-induced norepinephrine release by cocaine, phenoxybenzamine and desipramine. *J Pharmacol Exp Ther* 175:533-40.
- Sulzer D, Galli A (2003) Dopamine transport currents are promoted from curiosity to physiology. *Trends Neurosci* 26:173-6.
- Sulzer D, Sonders MS, Poulsen NW, Galli A (2005) Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Prog Neurobiol* 75:406-33.
- Szasz BK, Mayer A, Zsilla G, Lendvai B, Vizi ES, Kiss JP (2005) Carrier-mediated release of monoamines induced by the nicotinic acetylcholine receptor agonist DMPP. *Neuropharmacology* 49:400-9.
- Szasz BK, Mike A, Karoly R, et al (2007a) Direct Inhibitory Effect of Fluoxetine on N-Methyl-D-Aspartate Receptors in the Central Nervous System. *Biol Psychiatry*.
- Szasz BK, Vizi ES, Kiss JP (2007b) Nicotinic acetylcholine receptor antagonistic property of the selective dopamine uptake inhibitor, GBR-12909 in rat hippocampal slices. *Neuroscience* 145:344-9.
- Tejani-Butt SM, Brunswick DJ, Frazer A (1990) [3H]nisoxetine: a new radioligand for norepinephrine uptake sites in brain. *Eur J Pharmacol* 191:239-43.
- Teng L, Crooks PA, Buxton ST, Dwoskin LP (1997) Nicotinic-receptor mediation of S(-)-nornicotine-evoked ³H-overflow from rat striatal slices preloaded with ³H-dopamine. *J Pharmacol Exp Ther* 283:778-87.
- Toth PT, Miller RJ (1995) Calcium and sodium currents evoked by action potential waveforms in rat sympathetic neurones. *J Physiol (London)* 485 (Pt 1):43-57.
- Travagli RA, Williams JT (1996) Endogenous monoamines inhibit glutamate transmission in the spinal trigeminal nucleus of the guinea-pig. *J Physiol (London)* 491 (Pt 1):177-85.
- Trendelenburg U (1991) The TiPS lecture: functional aspects of the neuronal uptake of noradrenaline. *Trends Pharmacol Sci* 12:334-7.
- Trullas R, Skolnick P (1990) Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *Eur J Pharmacol* 185:1-10.

- Umbriaco D, Garcia S, Beaulieu C, Descarries L (1995) Relational features of acetylcholine, noradrenaline, serotonin and GABA axon terminals in the stratum radiatum of adult rat hippocampus (CA1). *Hippocampus* 5:605-20.
- Vanhoutte P, Bading H (2003) Opposing roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in neuronal calcium signalling and BDNF gene regulation. *Curr Opin Neurobiol* 13:366-71.
- Vaughan PF, Kaye DF, Reeve HL, Ball SG, Peers C (1993) Nicotinic receptor-mediated release of noradrenaline in the human neuroblastoma SH-SY5Y. *J Neurochem* 60:2159-66.
- Vizi ES (1979) Presynaptic modulation of neurochemical transmission. *Prog Neurobiol* 12:181-290.
- Vizi ES (1980a) Non-synaptic modulation of transmitter release: pharmacological implications. *Trends Pharmacol Sci* 2:172-175.
- Vizi ES (1980b) Modulation of cortical release of acetylcholine by noradrenaline released from nerves arising from the rat locus coeruleus. *Neuroscience* 5:2139-44.
- Vizi ES (1984): *Nonsynaptic interactions between neurons: modulation of neurochemical transmission*. Chichester/New York: John Wiley and Sons.
- Vizi ES, Harsing LG, Jr., Gaal J, Kapocsi J, Bernath S, Somogyi GT (1986) CH-38083, a selective, potent antagonist of alpha-2 adrenoceptors. *J Pharmacol Exp Ther* 238:701-6.
- Vizi ES, Kiss J, Eenkov IJ (1991) Presynaptic modulation of cholinergic and noradrenergic neurotransmission: interaction between them. *News Physiol Sci* 6:119-123.
- Vizi ES, Labos E (1991) Non-synaptic interactions at presynaptic level. *Prog Neurobiol* 37:145-63.
- Vizi ES, Sershen H, Balla A, et al (1995) Neurochemical evidence of heterogeneity of presynaptic and somatodendritic nicotinic acetylcholine receptors. *Ann N Y Acad Sci* 757:84-99.
- Vizi ES, Kiss JP (1998) Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interactions. *Hippocampus* 8:566-607.
- Vizi ES (2000) Role of High-Affinity Receptors and Membrane Transporters in Nonsynaptic Communication and Drug Action in the Central Nervous System. *Pharmacol Rev* 52:63-90.
- Vizi ES, Kiss JP, Lendvai B (2004a) Nonsynaptic communication in the central nervous system. *Neurochem Int* 45:443-51.
- Vizi ES, Rozsa B, Mayer A, Kiss JP, Zelles T, Lendvai B (2004b) Further evidence for the functional role of nonsynaptic nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol* 500:499-508.
- Vizi ES, Zsilla G, Caron MG, Kiss JP (2004c) Uptake and release of norepinephrine by serotonergic terminals in norepinephrine transporter knock-out mice: implications for the action of selective serotonin reuptake inhibitors. *J Neurosci* 24:7888-94.
- Wada E, Wada K, Boulter J, et al (1989) Distribution of alpha 2, alpha 3, alpha 4, and beta 2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 284:314-35.

- Walsh BT, Seidman SN, Sysko R, Gould M (2002) Placebo response in studies of major depression: variable, substantial, and growing. *Jama* 287:1840-7.
- Wang YM, Xu F, Gainetdinov RR, Caron MG (1999) Genetic approaches to studying norepinephrine function: knockout of the mouse norepinephrine transporter gene. *Biol Psychiatry* 46:1124-30.
- Watanabe Y, Saito H, Abe K (1993) Tricyclic antidepressants block NMDA receptor-mediated synaptic responses and induction of long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neuropharmacology* 32:479-86.
- Weissman MM, Bland RC, Canino GJ, et al (1996) Cross-national epidemiology of major depression and bipolar disorder. *Jama* 276:293-9.
- West AR, Galloway MP (1996) Intrastriatal infusion of (+/-)-S-nitroso-N-acetylpenicillamine releases vesicular dopamine via an ionotropic glutamate receptor-mediated mechanism: an in vivo microdialysis study in chloral hydrate-anesthetized rats. *J Neurochem* 66:1971-80.
- West AR, Galloway MP (1997) Endogenous nitric oxide facilitates striatal dopamine and glutamate efflux in vivo: role of ionotropic glutamate receptor-dependent mechanisms. *Neuropharmacology* 36:1571-81.
- White G, Lovinger DM, Peoples RW, Weight FF (1990) Inhibition of N-methyl-D-aspartate activated ion current by desmethylinipramine. *Brain Res* 537:337-9.
- White SR, Obradovic T, Imel KM, Wheaton MJ (1996) The effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy") on monoaminergic neurotransmission in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 49:455-79.
- Whitton PS, Biggs CS, Pearce BR, Fowler LJ (1992) Regional effects of MK-801 on dopamine and its metabolites studied by in vivo microdialysis. *Neurosci Lett* 142:5-8.
- Wilde MI, Benfield P (1995) Tianeptine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in depression and coexisting anxiety and depression. *Drugs* 49:411-39.
- Williams K (1993) Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* 44:851-9.
- Winkler J, Suhr ST, Gage FH, Thal LJ, Fisher LJ (1995) Essential role of neocortical acetylcholine in spatial memory. *Nature* 375:484-7.
- Wirkner K, Eberts C, Poelchen W, Allgaier C, Illes P (2000) Mechanism of inhibition by ethanol of NMDA and AMPA receptor channel functions in cultured rat cortical neurons. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362:568-76.
- Wong DT, Bymaster FP, Engleman EA (1995) Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. *Life Sci* 57:411-41.
- Wong ML, Licinio J (2001) Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci* 2:343-51.
- Wong ML, Licinio J (2004) From monoamines to genomic targets: a paradigm shift for drug discovery in depression. *Nat Rev Drug Discov* 3:136-51.

- Woodhull AM (1973) Ionic blockage of sodium channels in nerve. *J Gen Physiol* 61:687-708.
- Xu F, Gainetdinov RR, Wetsel WC, et al (2000) Mice lacking the norepinephrine transporter are supersensitive to psychostimulants. *Nat Neurosci* 3:465-71.
- Yamamoto BK, Novotney S (1998) Regulation of extracellular dopamine by the norepinephrine transporter. *J Neurochem* 71:274-80.
- Yoshioka M, Matsumoto M, Numazawa R, Togashi H, Smith CB, Saito H (1995) Changes in the regulation of 5-hydroxytryptamine release by alpha2-adrenoceptors in the rat hippocampus after long-term desipramine treatment. *Eur J Pharmacol* 294:565-70.
- Zarate CA, Jr., Singh JB, Carlson PJ, et al (2006) A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry* 63:856-64.
- Zhang X, Kindel GH, Wulfert E, Hanin I (1995) Effects of immobilization stress on hippocampal monoamine release: modification by mivazerol, a new alpha 2-adrenoceptor agonist. *Neuropharmacology* 34:1661-72.
- Zhou M, Baudry M (2006) Developmental changes in NMDA neurotoxicity reflect developmental changes in subunit composition of NMDA receptors. *J Neurosci* 26:2956-63.
- Zhou Z, Zhen J, Karpowich NK, et al (2007) LeuT-desipramine structure reveals how antidepressants block neurotransmitter reuptake. *Science* 317:1390-3.
- Zhu XZ, Luo LG (1992) Effect of nitroprusside (nitric oxide) on endogenous dopamine release from rat striatal slices. *J Neurochem* 59:932-5.
- Zoli M, Jansson A, Sykova E, Agnati LF, Fuxe K (1999) Volume transmission in the CNS and its relevance for neuropsychopharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 20:142-50.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönetet mondok mesteremnek, Dr. Vizi E. Szilveszternek, a Magyar Tudományos Akadémia elnökének, aki ideális kutatási feltételeket teremtett a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetben és szakmai iránymutatásával, tanácsaival megalapozta e munka sikerét. Szerencsésnek érzem magam, hogy tanítványa és munkatársa lehettem.

Köszönettel tartozom Dr. Lajtha Ábel professzornak, a Center for Neurochemistry (Orangeburg, New York) igazgatójának, aki Vizi professzorral együttműködve lehetővé tette, hogy három alkalommal is vendégkutatóként dolgozhassak intézetében. A disszertációban szereplő eredmények egy része az orangeburgi laboratóriumokban született. Ehelyütt szeretném megköszönni amerikai munkatársam, Dr. Henry Sershen és Dr. Tóth Jenő készséges és odaadó segítségét.

Külföldi együttműködő partnereim közül kiemelném Dr. Illés Péter professzor urat és Dr. Gerevich Zoltánt (Rudolf Boehm Institute of Pharmacology and Toxicology, University of Leipzig, Lipcse, Németország), akik az elektrofiziológiai vizsgálatokban nyújtottak nélkülözhetetlen segítséget, valamint Dr. Marc Caron professzort (Howard Hughes Medical Institute, Duke University Medical Center, Durham, NC, USA), aki a noradrenalin transzporter-hiányos egereket biztosította.

Budapesti kollégáim közül külön köszönet illeti Dr. Zsilla Gabriella, Dr. Zelles Tibor, és Dr. Mike Árpád kutatótársaimat, akik értékes közreműködése nélkül az eredmények jelentős része nem születhetett volna meg. Hálás szívvel gondolok tanítványaimra, Dr. Esteban Henningsre, Dr. Mandl Péterre, Dr. Szász Bernadette és Dr. Mayer Alizra, akik az évek folyamán segítettek megvalósítani elképzeléseimet. Hihetetlenül sok segítséget kaptam Meskó Györgynétől, aki lelkes munkájával a Gyógyszerhatástani Laboratórium egyik legértékesebb tagja volt, valamint Windisch Katalintól, Öszi Judittól és Tischler Erikától, akik számos közös kísérletben vettek részt.

A név szerint említetteken kívül köszönettel tartozom a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Gyógyszerkutató Osztálya többi dolgozójának, valamint az intézet további munkatársainak, akik sokszor siettek segítségemre az évek során.

Végezetül köszönetet szeretnék mondani Édesanyámnak szeretetéért, féltő gondoskodásáért és áldozatos munkájáért, ami lehetővé tette számomra, hogy olyan pályára kerülhessek, ahol örömet lelem a munkámban, és Feleségemnek szerelméért, türelméért és megértéséért, ami lehetővé tette, hogy eredményesen dolgozhassak ezen a pályán.

10. AZ ÉRTEKEZÉSBEN HASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

5-HT	szerotonin
DA	dopamin
DAT	dopamin transzporter
DMI	desipramin
DMPP	dimetilfenil piperazinium
DOPAC	dihidroxy fenilecetsav
Flx	fluoxetin
GFP	green floreszcens protein
HVA	homovanillinsav
L/D-NAME	L/D-nitroarginin-metilészter
MAO	monoamin oxidáz
MLA	methyllycaconitine
NA	noradrenalin
nAChR	nikotinikus acetilkolin receptor
NET KO	noradrenalin transzporter-hiányos állat
NET	noradrenalin transzporter
NMDA	N-metil-D-aszpartát
NO	nitrogén monoxid
NOS	nitrogén monoxid szintetáz
SERT	szerotonin transzporter
SNP	sodium nitroprussid
SSRI	szelektív szerotonin reuptake inhibítor
TM	transzmembrán
TTX	tetrodotoxin
WT	vad típusú (wild-type)